

corr to EP 0907484

특 2000-0068705

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[®]
G01N 33/569

(11) 공개번호 특 2000-0068705
(43) 공개일자 2000년 11월 25일

(21) 출원번호	10-1999-7002917
(22) 출원일자	1999년 04월 03일
번역문제출일자	1999년 04월 03일
(86) 국제출원번호	PCT/JP1998/03476
(86) 국제출원출원일자	1998년 08월 04일
(81) 지정국	■ 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투 칼 스웨덴 핀란드 사이프러스 국내특허 : 캐나다 중국 대한민국 미국
(30) 우선권주장	97/209515 1997년 08월 04일 일본(JP) 97/209522 1997년 08월 04일 일본(JP) 98/218136 1998년 07월 31일 일본(JP)
(71) 출원인	가부시끼가이샤 센탈 세메 가가꾸 겐꾸쇼 야스모토 테쓰 일본국 사이타마 이루마군 오이마찌 니시쓰루가오카 1조메 3방 1고
(72) 발명자	아오야기가쓰미 일본사이타마켄이루마군오히마치니시쓰루가오카1초메3반1고 오후에치하루 일본사이타마켄이루마군오히마치니시쓰루가오카1초메3반1고 미이다구미코 일본사이타마켄이루마군오히마치니시쓰루가오카1초메3반1고 기무라다쓰지 일본사이타마켄이루마군오히마치니시쓰루가오카1초메3반1고 야기신타로 일본사이타마켄이루마군오히마치니시쓰루가오카1초메3반1고 이병호
(74) 대리인	

설사성구 : 있음

(54) 바이러스 검출 또는 검정 방법

요약

(1) 음이온성 계면활성제와 (2) 양쪽성 계면활성제, 바이온성 계면활성제 또는 단백질 변성제를 함유한 처리 용액으로 바이러스-함유 샘플을 처리할을 특징으로 하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법; 이 처리 방법을 사용하여 바이러스를 검정하는 방법; (1) 카오토로픽 이온과 (2) 산성화제를 함유한 처리 용액으로 바이러스-함유 샘플을 처리할을 특징으로 하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법; 탄소수 10 이상의 알킬과 아자, 삼자 또는 사자 아민을 갖는 계면활성제 및/또는 바이온성 계면활성제의 존재하에 탐침에 대한 항체의 결합을 기초로 하여 바이러스 항원과 바이러스 항체를 검정할을 특징으로 하는 바이러스의 검정 방법; 및 이 방법을 실시하기 위한 모노클로날 항체 및 이를 생성하는 항체도마.

도표도

도1

석인여

바이러스-함유 샘플, 음이온성 계면활성제, 양쪽성 계면활성제, 바이온성 계면활성제, 카오토로픽 이온, 바이러스의 검정 방법

증서류

기술분야

현재, 혈액 또는 혈액 산물중에서 감염 바이러스를 검출하고 질환자로부터 바이러스의 존재를 확인하기 위해 다양한 바이러스 검출 방법이 사용되고 있다. 그러나, 이들 방법은 검출 대상 바이러스의 유형에 따라 민감성과 특이성이 다를 수 있으나 항상 고도의 민감성과 특이성을 나타내는 것은 아니다. 게다가 이들 방법이 충분한 민감성과 특이성을 나타낼 때는 바이러스를 배양하고 분리하는 경우에서처럼 많은 비용과 복잡한 절차를 동반한다. 본 발명의 배경과 관련하여 이하에서는 C형 간염에 대하여 상세히 언급될 것이다.

현경기술

C형 간염의 원인균은 오랜 기간동안 밝혀지지 않다가 C형 간염 바이러스의 유전자가 클로닝되고(Science 244: 359-362, 1989) 미 유전자를 기초로 만든 재조합 항원을 이용한 항체 측정에 의한 진단 방법이 개발되면서(Science 244: 362-364, 1989; 일본 특허 공고(교화)2(1990)-500880), C형 간염은 주된 감염 경로로서 혈액 및 혈액 산물을 통해 전파되는 C형 바이러스(HCV)가 원인균인 감염성 질환인 것으로 밝혀졌다. 재조합 코어 항원과 재조합 NS3 항원이 부가되는 것으로서 소위 이세대 항체 시험 방법이 개발되면서, 현재 혈청을 시험함으로써 모든 HCV 환자를 실질적으로 식별할 수 있게 되었다. 이 방법으로 일본에서 수혈을 통해 전파된 거의 모든 HCV 감염은 극복될 수 있었다.

그러나, 사람 면역결핍 바이러스(HIV)에 의한 것과 같은 다른 바이러스 감염의 경우는 감염후 항체가 출현할 때까지 일정 기간 즉, 기존 시험 방법에 의해 바이러스가 등장되지 않는 소위 잠복기가 있다. 이것은 혈액의 판매가 법적으로 허용되는 지역이나 일본의 일부 지방에서 항체 시험 방법에 의해 등장될 수 있는 혈액-유래 성분으로 인한 미차 감염의 위험이 여전히 도사리고 있음을 의미한다. 또한, 항체 시험 방법은 미의 시험 원리때문에 감염으로부터 회복된 사람과 감염의 활동기에 있는 사람을 구별할 수 없다는 결점을 갖고 있다.

현재 C형 간염의 치료를 위해 인터페론(IFN)이 사용되고 있다. 그러나, 일부 연구가 HCV가 IFN에 의해 제거된 후 6개월이 경과하여 항체 역가가 감소하기 때문에 그 요법의 효능은 단지 HCV의 항체 역가를 측정함으로써만이 평가될 수 있다고 주장한다. 그러나, 항체 역가는 항원 자극의 감소후 또는 항원의 제거후 수개월이 지나서만이 항체 역가가 떨어지기 시작하기 때문에 IFN 투여로 원하는 시간과 정확성으로 HCV가 제거되었는지를 항체 시험만으로 결정하는 것은 불가능하다. 따라서, 그 요법을 모니터링하기 위해서 HCV 항체 외에 HCV 그 자체를 검출하는 것이 필요하다.

HCV의 혈중 수준은 B형 간염 바이러스(HBV)와 같은 다른 바이러스와 비교하여 아주 낮으며 HCV는 시험과를 통해서나 또는 속주로서 동물 등을 이용하여 증식될 수 없기 때문에 HCV의 바이러스 입자(바이러스 항원)를 직접 검출하는 방법을 설정하는 것이 어려웠다. 그러므로, 바이러스 항원을 검출하는 대신에, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 방법(Science 230: 1350-1354, 1985) 및 측색 DNA 검출 방법과 같이 게놈 RNA를 검출하는 방법이 개발되었다. 그러나, 바이러스 게놈을 검출하는 방법은 바이러스 항원을 검출하는 방법에 비하여 몇 가지 문제점을 안고 있다.

첫째, 검출 대상 물질이 저장 동안에 아주 불안정한 RNA이기 때문에 혈청을 동결 및 해동하는 절차가 측정치의 감소를 일으킬 수 있음이 지적되어 왔다. 따라서, 시험될 혈청 샘플은 이들이 다른 검정 방법에서 사용될 때 보다 더욱 주의 깊게 저장되어야 한다. 또한, 샘플을 운송하는데도 대단한 주의를 기울여야 한다.

비록 PCR 방법의 사용을 포함한 시험 방법은 유전자 단편을 검출하는데 가장 민감할지라고 이들 방법은 게놈 RNA로부터 주형 DNA로의 역전사를 흔히 손실을 동반하며 따라서 정확한 정량치를 얻는데 상당한 기술을 요구하며 증폭은 이들 방법에 있어서 중요한 근본이기 때문에 오염의 경우에 높은 가양성(false-positive)이 발생할 수 있기 때문에 한번에 다른 종의 샘플을 다루는 것은 불가능하다는 점에서 문제가 있다. 게다가, 간단한 절차로 이루어지는 방법을 조차도 샘플을 다루는데 2시간 이상이 걸리며 원심분리와 같은 반복된 절차가 필요하기 때문에 복잡하다. 또한, 그러한 복잡한 절차는 오염의 기회를 증가시키는 결과를 초래하며 그럼으로써 가양성 결과를 얻을 확률이 증가한다. 한편, 측색 DNA 검출 방법은 검출 민감도가 낮으며 게다가 시험 결과를 얻는데 약 20시간이 걸려(Igaku to Yakugaku [Medicine and Pharmacology] 31:961-970, 1994) 민감성 및 진행 시간의 관점에서 개선해야 할 점을 많이 안고 있다.

바이러스 게놈을 검출하는 방법과 관련된 상기 문제점을 해결하기 위하여 바이러스 항원의 직접 검출을 포함한 방법이 개발되었다. 일본 미쓰사 특허공개 1986-29427에 기술된 바와 같이 코어 항원에 특이적인 모노클로날 항체를 사용하여 혈청에서 HCV의 코어 항원을 검출하는 방법이 개발되었다. 문현(Tanaka et al., Journal of Hepatology 23: 742-745, 1995, 및 Fujino et al., Igaku to Yakugaku [Medicine and Pharmacology] 36: 1065-1070, 1996)이 보고하는 바와 같이, 혈청에서 코어 항원을 검출하는 방법은 바이러스 게놈을 검출하는 상기 방법과 마찬가지로 임상적으로 유용한 것으로 제시되어 왔다. 그런, 바이러스 게놈을 검출하는 방법에서와 같이 해결이 필요한 몇 가지 주요 문제점이 여전히 남아 있다.

한가지 그와 같은 문제점은 혈청 스크리닝의 최종 시험 방법으로서 사용될 수 없을 만큼 PCR 방법에 비하여 민감성이 낮다는 것이다. 문현(Tanaka et al., Journal of Hepatology 23: 742-745, 1995)은 검출 한 계가 HCV RNA의 m 당 $10^4 - 10^6$ 복제수임을 보여주고 있다. 문현(Fujino et al., Igaku to Yakugaku [Medicine and Pharmacology] 36: 1065-1070, 1996)에 따르면 본 방법은 가장 민감한 CRT(경쟁 면 전사)-PCR 방법에 의해 RNA 양성으로 판명된 만성 C형 간염 환자의 102개 혈청에 대해 67%의 양성을 보여준 것으로 나타났다. 요컨대, 민감성의 관점에서 본 방법은 가장 민감한 CRT-PCR 방법보다 뒤쳐져 있다.

게다가, 측정 시 샘플을 처리하기 위해 복잡하고 많은 시간을 요하는 절차는 이 방법이 스크리닝에 사용될 때 문제점으로 지적되고 있다. 따라서, 본 방법은 바이러스 입자의 농축 및 혈청 성분의 제거를 위한 풀리에틸렌 글리콜 처리(4°C , 1시간), 원심분리(15분간), 상동물의 제거, 요소 처리, 알カリ 처리(37°C , 30분), 중화제 첨가 등을 포함한 다단계 샘플(혈청) 처리 절차를 요한다. 또한, PEG 처리로 인해 정도가 증

가된 첨전물을 요소로 분산시키는 과정은 상당한 기술을 요구한다. 따라서, 반복된 결과를 얻기 위하여 상당한 기술이 필요할은 물론 적어도 2시간의 처리 시간이 필요하다. 게다가, 원심분리, 상등을 제거 등과 같은 과정은 자동화할 수 없으며 많은 샘플을 동시에 처리하는 것은 어렵다. 따라서, 취급의 관점에서 본 방법은 스크리닝 시험에서와 같이 많은 용량의 샘플을 처리해야 하는 응용부분에는 적합하지 않다.

한편, 바이러스 항원 검출 시스템은 하기 관점에서 고도로 민감한 PCR 방법보다 우수하다. 따라서, 이 시스템은 검출 단계에서 과다한 증폭 절차가 없기 때문에 거의 오염되지 않는다. 게다가, 이 시스템은 불안정한 RNA 대신에 비교적 안정한 항원 단백질을 검출하는 것이기 때문에 샘플을 저장하는데 특별한 주의나 PCR에 의해 검출된 샘플을 위해 필요한 냉동기와 같은 특별한 장치가 필요 없으며 또한 샘플의 운송이 보다 쉽다.

이러한 특징은 혈액 사업 및 검진 시험에서와 같이 다수의 샘플을 측정하는 분야에 적합하다. 그러나, 상기 지적한 바와 같이 코어 항원을 검출하는 공개된 방법은 자동화할 수 없고 민감성이 낮기 때문에 혈액 산업에서와 같이 높은 민감성을 요하는 분야에서 표준이 될 수 없으며 PCR 방법보다 이로운 특징을 최적으로 이용할 수 없다. 게다가, 임상적으로 유용한 결정 방법은 민감성, 특이성, 재현성, 취급 간편성 및 저렴한 비용을 위해 항상 도전되어야 하며 이러한 도전으로부터 가능한 많은 만족을 얻기 위하여 지속된 노력이 필요하다. 특히 다수의 샘플을 스크리닝하는데 사용하기 위해 HCV와 다른 바이러스 항원의 검출에 관하여 PCR 방법에 비하여 민감성이 낮고 원하는 항원이 완전하게 노출될 수 없기 때문에 실용되지 못하는 방법이 많이 있다.

발명의 실성과 솔루션

본 발명의 목적은 혈액 사업 및 건강 진단에서 실시하는 스크리닝에서처럼 다수의 샘플을 처리하는데 적합한 HCV 항원의 검출방법을 포함한 여러 바이러스 항원을 검출하는 방법을 제공하는데 있다. 달리 표현한다면, 본 발명의 목적은 간단한 예비처리를 허용하는 PCR 방법과 대등한 민감성과 특이성을 나타내거나 예비처리 없이 쉽게 자동화할 수 있는 HCV 항원의 검출방법을 포함한 여러 바이러스 항원의 검출 시스템을 제공하는데 있다. 본 발명의 바탕작한 양태는 미하에서 HCV를 주된 예로하여 설명될 것이다.

본 발명의 첫번째 양태(1)에 따르면, HCV 입자를 분쇄하고, 이 바이러스 항원을 완전히 노출시키고, 존재한다면 그 바이러스 항원에 대한 항체를 분쇄하고, 그 바이러스 항원을 검출 또는 측정함으로써 HCV를 검출 또는 측정하는 수단이 제공된다.

따라서, 본 발명은 바이러스-함유 샘플을 (1) 음이온성 계면활성제와 (2) 양쪽성 계면활성제, 비이온성 계면활성제 또는 단백질 변성제를 함유한 처리 용액으로 처리함을 특징으로 하여 바이러스-함유 샘플을 처리하는 방법(1)을 제공한다.

또한, 본 발명은 바이러스-함유 샘플을 (1) 음이온성 계면활성제, (2) 양쪽성 계면활성제와 (3) 비이온성 계면활성제 또는 단백질 변성제를 함유한 처리 용액으로 처리함을 특징으로 하여 바이러스-함유 샘플을 처리하는 방법(II)을 제공한다.

또한, 본 발명은 바이러스-함유 샘플을 (1) 음이온성 계면활성제, (2) 양쪽성 계면활성제, (3) 비이온성 계면활성제와 (4) 단백질 변성제를 함유한 처리 용액으로 처리함을 특징으로 하여 바이러스-함유 샘플을 처리하는 방법(III)을 제공한다.

또한, 본 발명은 바이러스 항원의 존재를 검출하거나 정량하기 위해 상기 방법(I) 내지 (III) 중의 어느 한 샘플 처리 방법을 사용하고 샘플을 바이러스 항원을 특이적으로 인식하는 탐침과 반응시킴을 특징으로 하는 바이러스 결정 방법(IV)을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 면역검정 방법(IV)에 사용하고 음이온성 계면활성제를 포함하는 것으로서, 샘플중의 바이러스의 유무를 결정하기위한 키트, 결정 키트 또는 전단 시약을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 면역검정 방법(IV)에 사용하고 하기된 모노클로날 항체를 포함하는 것으로서, 샘플중의 바이러스의 유무를 결정하기위한 키트, 결정 키트 또는 전단 시약을 제공한다.

본 발명의 첫번째 양태(2)에 따르면, 바이러스 입자를 분쇄하고, 이 바이러스 항원을 완전히 노출시키고, 존재한다면 그 바이러스 항원에 대한 항체를 분쇄하고, 그 바이러스 항원을 검출 또는 측정함으로써 HCV를 검출 또는 측정하는 수단이 제공된다.

따라서, 본 발명은 바이러스-함유 샘플을 (1) 카오토로픽 미온과 (2) 산성화제를 함유한 처리 용액으로 처리함으로 특징으로 하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법(V)을 제공한다.

또한, 본 발명은 바이러스-함유 샘플을 (1) 카오토로픽 미온, (2) 산성화제와 (3) 비이온성 계면활성제를 함유한 처리 용액으로 처리함으로 특징으로 하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법(VI)을 제공한다.

또한, 본 발명은 바이러스 항원의 존재를 검출하거나 정량하기 위해 상기 방법(V) 내지 (VI)에 따른 샘플 처리 방법을 사용하고 샘플을 바이러스 항원을 특이적으로 인식하는 탐침과 반응시킴을 특징으로 하는 바이러스 결정 방법(VII)을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 면역검정 방법(VII)에 사용하고 카오토로픽제를 포함하는 것으로서, 샘플중의 바이러스의 유무를 결정하기 위한 키트, 결정 키트 또는 전단 시약을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 면역검정 방법(VII)에 사용하고 하이브리도마 HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004) 또는 HC11-11 (FERM BP-6005)에 의해 생성된 모노클로날 항체를 포함하는 것으로서, 샘플중의 바이러스의 유무를 결정하기위한 키트, 결정 키트 또는 전단 시약을 제공한다.

본 발명의 두번째 양태에 따르면, 바이러스에 대한 항체가 아직 형성되지 않은 잠복기 동안에 바이러스 항원을 검출 또는 측정하는 방법이 제공된다. 이 방법에서는 바이러스 입자를 분쇄하여 바이러스 항원을 노출시키는 것으로 충분하며 혈중의 바이러스 항원에 대한 항체를 분쇄할 필요가 없다.

따라서, 본 발명은 탄소수 10 이상의 알킬기 및 미자, 삼자 또는 사자 아민을 갖는 계면활성제, 친수/친유기 평형(HLB) 0.1~12 대지 14인 바이온성 계면활성제 또는 이를 모두의 존재하에서 바이러스 항원을 탐침과 결합시키는 것을 기초로 하여 바이러스 항원을 측정함을 특징으로 하는 바이러스 검정방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 HCII-14 (FERM BP-6005), HCII-14 (FERM BP-6006), HCII-10 (FERM BP-6004), HCII-3 (FERM BP-6002) 및 HCII-7 (FERM BP-6003)으로 이루어진 그룹중에서 선택된 하이브리도마 세포주를 제공한다.

또한, 본 발명은 HCII-14 (FERM BP-6005), HCII-14 (FERM BP-6006), HCII-10 (FERM BP-6004), HCII-3 (FERM BP-6002) 및 HCII-7 (FERM BP-6003)으로 이루어진 그룹중에서 선택된 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 모노클로날 항체를 제공한다.

RNA 바이러스인 HCV 및 DNA 바이러스인 HBV는 구조 단백질로 캡슐화된 게놈 RNA 또는 DNA와 이를 에워싸고 있는 막단백질 또는 지질 단백질을 포함하는 구조의 바이러스 입자를 형성하는 바이러스이다. 어느 양태에 서든 본 발명의 처리 방법을 사용함으로써, HCV 또는 HBV는 물론 이들과 구조가 유사한 바이러스의 바이러스 입자를 분리하고 바이러스 항원을 완전히 노출시키고 그 바이러스 항원을 검출 또는 측정함을 특징으로 하는 바이러스의 검출 또는 측정이 제공된다.

도면의 간략한 설명

도 1은 첨가된 SDS의 농도가 샘플 처리에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인으로부터 채취된 혈청(정상) 및 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13 및 500I 사용되었다.

도 2는 첨가된 CHAMPS의 농도가 샘플 처리에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인으로부터 채취된 혈청(정상) 및 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13 및 500I 사용되었다.

도 3은 첨가된 요소의 농도가 샘플 처리에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인으로부터 채취된 혈청(정상) 및 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13, 44 및 500I 사용되었다.

도 4는 첨가된 트리톤 X100의 온도가 샘플 처리에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인으로부터 채취된 혈청(정상) 및 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13, 44 및 500I 사용되었다.

도 5는 샘플 처리 동안의 온도 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인으로부터 채취된 혈청(정상) 및 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13, 44 및 500I 사용되었다.

도 6은 1 U/ml로서 정의된 표준 패널 혈청 50을 연속 희석하여 샘플 처리 방법에 적용한 다음 본 발명의 모노클로날 항체를 사용하여 측정한 샌드위치 검정 시스템의 희석 표준 곡선 및 검출 한계를 보여주는 그래프이다.

도 7은 1 U/ml로서 정의된 표준 패널 혈청 50을 연속 희석하여 샘플 처리 방법에 적용한 다음 측정한 샌드위치 면역검정 시스템의 희석 표준 곡선 및 검출 한계를 보여주는 그래프이다.

도 8은 샘플 처리 방법에 적용한 패널 혈청 13의 젤 여과 컬럼으로 분별하여 얻은 분획내의 코어 항원의 면역 활성을 보여준다. IgG 및 일부분의 분자량은 각각 약 150kD 및 약 68kD이다.

도 9는 본 발명의 샘플 처리 방법에 적용한 PCR-양성 샘플에 대해 엠플리코어 HCV 모니터(PCR 방법)를 사용하여 측정한 HCV-RNA의 양과 방출된 코어 항원의 활성 사이의 상관관계를 보여주는 그래프이다.

도 10은 첨가된 구아니딘 클로라이드의 농도가 샘플 처리에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인으로부터 채취된 혈청(정상)과 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13 및 500I 사용되었다.

도 11은 첨가된 트리톤 X100의 농도가 샘플 처리에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인으로부터 채취된 혈청(정상)과 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13 및 500I 사용되었다.

도 12는 첨가된 트윈 20의 농도가 샘플 처리에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인으로부터 채취된 혈청(정상)과 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13 및 500I 사용되었다.

도 13은 샘플 처리 동안에 온도가 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 건강한 정상인을부터 채취된 혈청(정상)과 HCV-RNA-양성 패널 혈청 13 및 500I 사용되었다.

도 14는 1U/ml로서 정의된 표준 패널 혈청 50을 연속 희석하여 샘플 처리 방법에 적용한 다음 측정한 샌드위치 면역검정 시스템의 희석 표준 곡선 및 검출 한계를 보여주는 그래프이다.

도 15는 샘플 처리 방법에 적용한 패널 혈청 13의 젤 여과 컬럼으로 분별하여 얻은 분획내의 코어 항원의 면역 활성을 보여준다. IgG 및 일부분의 분자량은 각각 약 150kD 및 약 68kD이다.

도 16는 본 발명의 샘플 처리 방법에 적용되고 엠플리코어 HCV 모니터(PCR 방법)에 의해 양성으로 시험된 샘플에 대해 엠플리코어 HCV 모니터(PCR 방법)를 사용하여 측정한 HCV-RNA의 양과 방출된 코어 항원의 활성 사이의 상관관계를 보여주는 그래프이다.

도 17은 본 발명에 따른 재조합 B형 간염 바이러스(HBV) 코어 항원의 측정에 의해 얻은 표준 곡선을 보여준다.

본 발명을 실시를 위한 최적 방식

본 발명의 당해 바이러스는 구조 단백질로 캡슐화된 게놈 RNA 또는 DNA와 이를 에워싸고 있는 막 단백질 또는 지질 막을 포함하는 구조의 바이러스 입자를 형성하는 바이러스이다.

게놈으로서 RNA를 갖는 상기 바이러스의 대표적인 예로는 C형 간염 바이러스(HCV) 및 HCV-연관된 바이러스가 포함된다.

HCV-연관된 바이러스에는 M형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, G형 간염 바이러스, 수족구 질환 바이러스, 플라비바이러스 (황열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 뎅그열 바이러스), 토가 바이러스 (알파 바이러스, 루비바이러스, 아테리바이러스, 루벨라바이러스), 페스티바이러스 (돼지 클레라 바이러스, 소 미질 바이러스), 파라마이소바이러스 (파라미플루엔자 바이러스 1, 2, 3, 4, 개 질병 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, RS 바이러스, 무역 바이러스, 원숭이 파라인플루엔자 바이러스, 풀역 바이러스, 유형성 미하나염 바이러스), 오르토마이크소바이러스 (사람 인플루엔자 바이러스, 조류 인플루엔자 바이러스, 말 인플루엔자 바이러스, 돼지 인플루엔자 바이러스), 라브도바이러스 (광견병 바이러스, 소수 포성구내염 바이러스), 피코나바이러스 (풀리오바이러스, 록사카바이러스, 에코바이러스, 소 엔테로바이러스, 돼지 엔테로바이러스, 원숭이 엔테로바이러스, 마우스 뇌염 바이러스, 사람 리노바이러스, 소 리노바이러스, 말 리노바이러스, 족구 질병 바이러스, A형 간염 바이러스), 코로나바이러스 (사람 코로나바이러스, 조류 감염 성 기관지염 바이러스, 마우스 간염 바이러스, 돼지 전파성 위장염 바이러스), 아레나바이러스 (임파구성 맥락수막염, 라사 바이러스, 한국 유행성출혈열 바이러스), 레트로바이러스 (HTLV: 사람 성인 백혈병 바이러스, HIV: AIDS 바이러스, 고양이 백혈병 육종 바이러스, 소 백혈병 바이러스, 투스 육종 바이러스), 레오바이러스 (로타바이러스), 칼시바이러스 (노르윌크 바이러스), 번야바이러스 (신장 증후군 유행성 출혈 열 바이러스), 필로바이러스 (에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스) 등이 포함된다.

게놈으로서 DNA를 갖는 상기 바이러스의 대표적인 예로는 B형 간염 바이러스 HBV 및 HBV-연관된 바이러스가 포함된다. HBV-연관된 바이러스는 천연두 바이러스 (백시니아 바이러스, 알라스트림 바이러스, 우드 바이러스, 두창 바이러스), 파라보바이러스 (사람 파라보바이러스, 돼지 파라보바이러스, 소 파라보바이러스, 개 파라보바이러스, 고양이 백혈구감소증 파라보바이러스, 알루시안 링크 질병 바이러스), 파보바바이러스 (유두종 바이러스, 풀리오마 바이러스), 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스 (헤르페스 심플렉스 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 수두 헤르페스 조스터 바이러스, EB 바이러스, 말 헤르페스 바이러스, 마렉 질병 바이러스), 아프리카 돼지 클레라 바이러스 등을 포함한다.

상기와에도 많은 병원성 바이러스가 알려져 있으며 또한 존재하나 동정되지 않은 바이러스도 많이 있다. 이러한 바이러스들이 상기한 바와 같이 구조 단백질이 게놈 RNA 또는 DNA를 캡슐화하고 이를 막 단백질 또는 지질 막이 메워싸고 있는 구조를 하고 있다면 이들은 본 발명의 샘플 처리 방법을 사용하여 면역검정에 적합한 형태로 방출될 수 있음이 명백하다.

본 발명을 실시하는 양태는 이하에에서 HCV를 참고로 하여 설명될 것이다. HCV의 혈중 수준이 HDV(10^6 복제수/ml) 보다 낮은 10^2 복제수/ml 내지 10^6 복제수/ml이기 때문에 그 바이러스 항원을 검출하는 검정은 아주 고도의 민감성을 요구한다.

일반적으로, 텁첨으로서 항체를 사용하는 면역학적 방법에 의해 대표되는 검출 방법에 있어서, 검출 민감성을 향상시킬 수 있는 가능한 방법은 검출될 항원 분자의 수를 증가시키는 것(I), 항원과 결합하는 탐침 분자(예, 항체)의 수를 증가시키는 것(II), 항원이외의 다른 물질과 텁첨(예, 항체)과의 결합에 의해 발생된 검출 민감성을 한정하는 비특이적 반응을 감소시키는 것(III) 및 검출에 사용하는 라벨의 검출 한계를 증가시키는 것(IV)을 포함한다. 또한, 이를 방법의 적당한 조합도 민감성을 높일 수 있을 것이다.

항원 분자의 수를 증가시키는 방법으로서, 샘플의 양을 증가시키는 것(I-1)이 가장 쉽게 실시될 수 있다. 그러나, 흔히 사용되는 반응 시스템(예, 96-웰 면역평판)에 첨가되는 최대량은 약 300μl를 초과할 수 없기 때문에, 반응시스템에 첨가될 분자의 수를 증가시키는 농축 방법이 사용되었다.

항원과 결합하는 탐침(예, 항체 분자)의 수를 증가시키기 위하여, 가장 쉽게 실시되는 수단은 복수 텁첨(예, 항체)를 사용하여 인자될 에피토프의 수를 증가시키는 것(II-1) 및 항원과 탐침(예, 항체)의 친화성(친화성 및 결합성)을 높임으로써 단위 시간당 결합된 항체의 수를 증가시키는 것(II-2)을 포함한다. 덧붙어서 언급하면, 예를 들어 항체의 친화성을 증대시킬 수 있는 방법으로는 반응계에서 완충액의 조성물을 변화시키는 방법, 텁첨을 변경하는 방법 및 이를 양 방법을 조합하는 것이 포함된다. 또한, 다수의 항체를 비드, 자성 입자 등과 같이 표면적이 넓은 캐리어에 결합시켜 한정된 양의 항원과 반응하는 면적을 확장함으로써 많은 항원을 포획하는 방법이 실시된다.

감염성 질환의 경우에 항원과의 높은 결합 친화성을 갖는 사람 항체가 샘플에 존재하는 것으로 기대된다. 따라서, 이를 항체의 에피토프는 검출에서 사용되는 탐침(예, 항체)의 에피토프와 중복하여 경쟁적 반응이 일어나고 결국 검출에 사용되는 항체의 수를 감소시키는 것으로 기대된다. 따라서, 샘플내에 그러한 방해 항체가 감소되는 것은 항원과 결합하는 검출용 항체 분자의 수를 증가시키는 결과로 미아진다(II-3).

사실, 비특이적 반응을 감소시키는 방법을 보편화하는 것은 어려우나, 완충액의 조성을 변화시킴으로써 항원과 탐침(예, 항체)과의 친화성(친화성 및 결합성)을 증대시켜 비특이적 반응을 줄이거나(II-1) 비특이적 반응의 원인물을 제거하거나(II-2) 하여 비특이적 반응을 줄이는 전략이 실시된다.

검출 민감성을 향상시킬 수 있는 방법으로는 고도의 검출 민감성을 갖는 라벨(방사성동위원소 등)을 사용하는 것(IV-1), 라벨로서 효소 또는 촉매를 사용함으로써 시그널을 증폭시키는 것(IV-2), 효소 기질을 좀 더 고도의 민감성을 갖는 것으로 변화시키는 것(IV-3), 전기적 또는 기계적 수단에 의해 효소반응 또는 화학반응으로부터 시그널을 증폭하는 것(IV-4), 항체당 라벨의 수를 증가시키는 것(IV-5), 시그널 검출에 사용된 기기의 민감성을 강화하는 것(IV-6) 등이 포함된다.

HCV 코어 항원을 검출하기 위해 공개된 방법에서 예비처리 단계를 분석한 결과 그 방법은 샘플에 풀리에틸렌 글리콜을 첨가함으로써 항원을 농축시킨 다음 원심분리하여 첨전물로서 HCV를 회수하고(I-2) 동시에 혈청 성분의 일부를 제거하는(II-2) 단계를 포함하고 이 단계에 이어서 첨전물을 요소와 알카리제가 함유된 용액에 재현탁시켜 그에 존재하는 사람 항체를 불활성화시킴으로써 HCV로부터 코어 항원을 방출시키는 단계(II-3), 모노클로날 항체와 반응하게 될 용액을 제조하기 위하여 비이온성 계면활성제(트리튬 X100)과 중화제를 함유한 용액을 첨가하는 단계를 포함하는 것으로 드러났다.

상기된 바와 같은 첨전물의 원심분리 및 재현탁은 절차상 복잡한 단계이고 상당한 기술을 요구한다. 따라서, 본 발명의 목적은 절차에 관한 상기 문제점을 해결하는 코어 항원 검출 시스템에 있다.

HCV 자체의 실체는 아직도 밝혀지지 않고 있다. 그러나, 게놈 구조, 관련된 바이러스 입자의 구조 및 바이러스에 대한 일반적인 정보를 기초로 하여 볼때, HCV 입자는 게놈 RNA가 코어 항원내에 패킹되어 있고 이것은 E1 및 E2/NS1 항원을 포함한 피복 단백질에 의해 캡슐화되어 있으며 이를 항원은 상기 패킹을 예워싼 지질막에 고정되어 있는 것으로 추정하고 있다.

따라서, 코어 항원을 검출하기 위하여 코어 항원의 검출에 사용되는 탐침(예, 항체)의 결합이 가능하도록 피복을 제거하는 것이 필요하다. 게다가, 혈중의 바이러스 입자는 입자가 L型(저밀도 지단백질)에 의해 둘러싸인 복잡한 구조를 하고 있는 것으로 보고되어 있으며, 또한 피복 단백질에 대한 항체가 존재하기 때문에, 바이러스 입자는 항-피복 단백질 항체와의 면역 복합체로서 존재할 수 있는 것으로 추정된다. 따라서, 검출될 항원 분자의 수를 증가시키기 위하여 바이러스 입자로부터 피복률과 바이러스 입자 주변의 오염률을 효율적으로 제거하고 코어 항원 분자를 효율적으로 방출시키는 것이 중요하다.

위 사실 내용은 HCV 외에 다른 바이러스에 대해서도 마찬가지로 적용되며 바이러스들의 구조 단백질은 효율적으로 방출되어야 한다.

따라서, 본 발명은 원심분리와 같은 복잡한 절차에 의해 항원을 놓축시키지 않고서도 샘플(혈청)내 바이러스 항원이 탐침을 사용하여 검출하는데 적합한 상태가 되도록 항원을 처리하는 방법에 관한 것이다.

또한, 사람 항체는 상기한 바와 같이 고 역ガ로 존재하여 결합에 있어서 탐침과 경쟁할 수 있기 때문에 항체를 제거하는 절차는 민감성을 향상시키는데 있어서 중요하다.

따라서, 본 발명의 한 가지 형태는 샘플내 바이러스 항원을 쉽게 방출하면서 동시에 샘플에 존재할 수 있는 사람 항체를 불활성화하는 처리 방법에 관한 것이다.

본 발명의 처리 방법을 사용함으로써, 샘플내 바이러스 항원은 항체와 같은 탐침과 면역 복합체를 형성하기에 적합한 형태로 바이러스 입자 또는 면역 복합체로부터 방출되며 동시에 샘플내에 존재하여 검출 반응을 방해하는 사람 항체를 불활성화시킴으로써, 항체와 같은 탐침을 사용한 면역검정에 의해 고도로 민감한 검출을 용이하게 얻을 수 있다.

본 발명의 제1 양태(1)에 따르면, 검출에 사용하기 위한 항체와 같은 탐침은 이 탐침이 특정 방식으로 바이러스 항원과 결합하고 특정의 높은 친화성을 지니며 반응계에 첨가되었을 때 비특이적 반응을 유도하지 않는다면 어떠한 것도 가능하다. 예를 들면, HCV 코어 항원의 검출시 실시예 4에 기술된 바와 같이 일차 반응에 사용된 탐침중 하나는 HCV 코어 항원의 C-말단을 인식하고 이에 결합할 수 있는 탐침을 함유하는 것이 바람직하다. 본원에 사용된 용어 코어 항원의 C-말단은 서열 20에 기술된 서열의 81번 내지 160번에 해당하는 서열 또는 미의 일부를 의미한다. 이것은 또한 HCV 코어 항원의 N-말단에 대한 탐침을 함유할 수 있다. 본원에 사용된 용어 코어 항원의 C-말단은 서열 20에 기술된 서열의 10번 내지 70번에 해당하는 서열 또는 미의 일부를 의미한다.

본 발명의 제2 양태(2)에 따르면, 검출에 사용하기 위한 항체와 같은 탐침은 이 탐침이 특정 방식으로 바이러스 항원과 결합하고 특정의 높은 친화성을 지니며 반응계에 첨가되었을 때 비특이적 반응을 유도하지 않는다면 어떠한 것도 가능하다. 예를 들면, HCV 코어 항원의 검출시, 일차 반응에 사용된 탐침중 하나는 HCV 코어 항원의 N-말단을 인식하고 이에 결합할 수 있는 탐침을 함유하는 것이 바람직하다. 본원에 사용된 용어 코어 항원의 N-말단은 서열 20에 기술된 서열의 10번 내지 70번에 해당하는 서열 또는 미의 일부를 의미한다. 이것은 또한 HCV 코어 항원의 C-말단에 대한 탐침을 함유할 수 있다. 본원에 사용된 용어 코어 항원의 C-말단은 서열 20에 기술된 서열의 81번 내지 160번에 해당하는 서열 또는 미의 일부를 의미한다.

상기 모든 양태에 있어서, 코어 항원에 대해 고도의 특이성 및 친화성을 나타내는 어떠한 분자도 탐침으로서 사용될 수 있으며 이 가운데 마우스, 토끼, 닭, 염소, 양, 소 등과 같은 실험동물들을 면역화함으로써 얻은 모노클로날 항체, 골수증 세포를 면역화된 개체로부터 분리된 비장 세포와 융합하여 얻은 하이브리도마에 의해 생성된 모노클로날 항체, EB 바이러스에 의해 불멸화된 비장 세포 또는 혈중 백혈구에 의해 생성된 모노클로날 항체, 및 HCV로 감염된 사람 또는 침팬치에 의해 생성된 항체, 마우스, 사람 등의 면역글루불린의 cDNA 또는 염색체 DNA로부터 얻은 가변 영역의 유전자 단편, 면역글루불린의 cDNA 또는 염색체 DNA의 일부를 인공적으로 조작된 서열과 조합하여 작제된 가변 영역의 유전자 단편, 인공적 유전자 서열을 사용하여 작제된 가변 영역의 유전자 단편 또는 상기한 것을 빌딩 블록으로서 사용하여 유전자 재조합 기술에 의해 작제된 가변 영역의 유전자 단편을 면역글루불린 불변 영역의 유전자 단편과 조합하여 형성된 재조합 항체 유전자로 형질전환된 세포에 의해 생성된 재조합 항체, 상기 가변 영역의 유전자 단편을 예를 들면 박테리오파마지의 구조 단백질과 융합시켜 생성된 파마지 항체, 상기 가변 영역의 유전자 단편을 예를 들면 myc 유전자와 같이 다른 적합한 유전자 단편의 일부와 조합하여 형성된 재조합 항체 유전자로 형질전환된 세포에 의해 생성된 재조합 항체, 가변 영역을 트립신 유전자내로 인공적으로 도입하여 생성된 탐침, 수용체와 같은 단백질에 특이적으로 결합하는 분자를 인공적으로 변형시켜 얻은 탐침, 조합된 화학 기술에 의해 작제된 탐침 등이 포함된다.

또한, 본 발명은 바이러스 항원을 함유한 샘플로부터 바이러스 항원과 미의 탐침(예, 항체)의 면역 복합체를 형성하기에 적합한 상태를 형성하기 위하여 바이러스 입자 또는 면역 복합체로부터 바이러스 항원을 방출할 수 있고 동시에 샘플에 존재하여 검출반응을 방해하는 사람 항체 조차도 불활성화할 수 있는 처리 용액으로 샘플을 처리하는 단계, 및 항체와 같은 탐침을 사용하여 면역검정에 의해 방출된 코어 항원을 검출 및 정량하기 위한 검정 방법 및 검정 키트를 제공한다.

본 발명에 의해 제공된 샘플 처리 용액 및 샘플 처리 방법

본 발명에 사용된 샘플은 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 뇌척수액, 간조직 등과 같은 생물학적 유액을 포함한다.

본 발명에 있어서, 가장 중요한 요건은 샘플을 복잡한 과정을 통해 처리하지 않고서도 모노클로날 항체와 같은 탐침과의 결합 반응에 적합한 상태를 형성하도록 샘플내 코어 항원과 같은 바이러스 항원을 처리하는 방법이다. 따라서, 항원 분자의 수를 증가시키기 위하여 바이러스 입자내에 함유된 코어 항원과 같은 바

이러스 항원을 효율적으로 방출시키는 것이 중요하다.

아미나트륨 도데실 셀레이트(SDS) 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 대하여 알려져 있는 바와 같이, 대부분의 단백질은 SDS의 존재하에 열처리에 의해 변성되며 그럼으로써 공유결합된 것 외의 다른 분자는 단량체로 전환된다. 따라서, SDS와 같은 음이온성 계면활성제를 포함한 처리제를 첨가하면 바이러스가 분쇄될 뿐만 아니라 샘플내 코어 항원과 같은 바이러스 항원에 대한 항체가 변성되어 샘플내 코어 항원과 같은 바이러스 항원의 방출이 일어난다. 이것은 실시예 7에서 보는 바와 같이 HCV 코어 항원으로부터 검증되었다. 즉, SDS가 함유된 처리제로 처리된 HCV-감염된 샘플내 코어 항원의 분자량을 겔 여과로서 분석하였을 때 코어 항원은 이론상 단량체의 위치인 것으로 추정되는 위치에서 검출되었다.

문헌[*Kashiwakuma et al., J. Immunological Methods 190: 79-89, 1996*]에 보고된 바와 같이, 재조합 HCV를 발현하는 세포의 추출물을 포함한 샘플로부터 SDS-PAGE에 의해 분리된 코어 항원을 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 검출할 때, 면역학적 활성을 단량체의 것으로 믿어지는 위치에서 검출된다. 샘플에 SDS를 포함한 변성제를 첨가하면 항원이 효율적으로 방출되고 항원 분자의 수가 증가된다는 것은 당업자는 쉽게 이해할 것이다.

그러나, 잘 알려져 있는 바로서 SDS와 같은 음이온성 계면활성제는 아주 강한 단백질-변성 효과를 나타내므로 항체와의 면역 복합체 형성 반응에 첨가될 때 항체도 또한 변성시키며 그럼으로써 그 기능을 불괴시켜 결과적으로 민감성의 감소를 초래한다. 또한, 음이온성 계면활성제의 처리에 의해 에피토프의 구조가 파괴되며 결국 항체와의 결합이 약화되어 이는 민감성의 감소로 이어지는 것으로 알려져 있다. 민감성의 감소를 초래하는 원인 인자를 제거하기 위하여 SDS 처리에 따른 변성 효과는 어떤 수단에 의해서든 약화시킬 필요가 있는 것으로 알려져 있다.

음이온성 계면활성제를 포함한 계면활성제는 투석, 초여과, 젤여과, 전기영동, 이온교환, 침강, 막전이 등과 같은 수단에 의해 제거될 수 있는 것으로 알려져 있다. 상기된 바와 같이 항원이 웨스턴 블롯 방법 또는 겔 여과 방법에 의해 검출될 수 있다는 사실은 SDS 처리후 특정 절차를 사용하여 항원-항체 반응이 달성될 수 있음을 가리킨다. 그러나, 이를 방법은 시간과 복잡한 절차를 필요로 하며, 본 발명의 목적에 적합하지 않다.

과량의 반응 용액으로 희석시킴으로써, 반응에 영향을 미치지 않는 미미한 수준으로 변성 효과를 줄이는 것은 가능하다. 그러나, 이 방법은 첨가되는 샘플의 양이 제한되어 있는 미소액가 헬을 사용하는 면역검정과 같은 방법에 적용할 수는 없다. 이러한 관점에서, 상기 방법은 본 발명의 목적에 적합하지 않음이 명백하다.

따라서, 본 발명자들은 본 발명의 첫번째 양태로서 음이온성 계면활성제와 일부 첨가제를 포함한 처리제의 처리가 음이온성 변성제에 의한 변성 효과를 항체와 같은 텁침이 영향을 받지 않는 수준으로 감소시킬 수 있음과 동시에 음이온성 계면활성제에 의한 코어 항원의 방출 효과를 증대시킬 수 있는지를 연구하였다.

본 발명자들은 SDS와 같은 음이온성 계면활성제외에 다른 계면활성제를 함유한 처리제의 첨가가 고정된 항체에 미치는 SDS의 변성 효과를 약화시킬 수 있으며 결과적으로 SDS를 단독으로 함유한 처리제의 첨가에 비교하여 민감성을 향상시킬 수 있음을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은 SDS외의 다른 계면활성제와 같이 수소이온 결합을 약화시키는 물질과 요소가 SDS와 같은 음이온성 계면활성제를 함유한 처리제에 첨가될 때 유사한 효과가 관찰되며 바이러스 입자로부터 코어 항원의 방출 및 샘플내 항-코어 항원 항체의 불활성화가 증가되고 더불어 코어 항원의 방출이 증대된다는 것을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은 SDS와 다른 계면활성제를 함유한 처리제의 첨가후 열처리에 의해 좀더 고도의 민감성으로 코어 항원의 검출이 달성됨을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

샘플의 처리를 위해 사용될 수 있는 SDS외의 다른 음이온성 계면활성제로는 나트륨 세틸 셀레이트 또는 다른 알킬 셀레이트, 에스테르, 알킬 셀포네이트, 예컨대, 나트륨 도데실 셀포네이트, 알킬 알릴 셀포네이트 등이 포함된다. 첨가될 수 있는 음이온성 계면활성제와 다른 계면활성제로는 양쪽성 계면활성제, 예를 들면 CHAPS(3-(3-클라미도프로필)디메틸암모니오)-1-프로판설포네이트), CHAPSO(3-(3-클라미도프로필)디메틸암모니오)-2-하이드록시-1-프로판설포네이트), 도데실-N-베탄인, 3-(도데실디메틸암모니오)-1-프로판설포네이트; 음이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐 에테르(예, 트리톤 X100), 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르(예, NP 40), 폴리옥시에틸렌 슬비톨 에스테르(예, 드원 80), 폴리옥시에틸렌 도데실 에테르(예, Brij 58) 및 옥틸 글루코시드가 포함된다. 바람직한 것은 CHAPS와 같은 양쪽성 계면활성제와 트리톤 X100과 같은 음이온성 계면활성제이다. 또한, 요소, 디오우레아 등과 같이 고도의 단백질 구조를 파괴하는 물질(단백질 변성제)를 첨가하는 것이 유리하다.

처리시 사용되는 바람직한 농도는 SDS의 경우 0.5% 이상, CHAPS의 경우 0.1% 이상, 요소의 경우 1M 이상, 트리톤 X100의 경우 0.75% 이하이다.

샘플의 처리시 사용되는 온도는 실험실에서 통상 사용되는 온도 즉 4°C 내지 100°C일 수 있다. 그러나, 음이온성 계면활성제가 첨가될 때 그의 윤점에 대해 주의가 요구된다. 바람직하게는 37°C 이상의 온도가 사용되며 혈청의 불활성을 위해 흔히 사용되는 50°C 내지 60°C의 온도에서 처리가 보다 효과적이다.

헤모글로빈에 의한 장해의 제거

측정을 위한 샘플로서 혈청 등이 사용될 때, 그 샘플에 함유된 적혈구 세포는 상기 예비처리동안에 용혈되고 헤모글로빈은 방출되며 변성된 헤모글로빈은 HCV 코어와 같은 바이러스 항원에 결합하여 측정을 방해할 수 있다. 따라서, 본 발명의 첫번째 양태로서, 헤모글로빈내의 헬을 포획함으로써 측정의 방해를 제거하는 것이 바람직하다. 이 목적을 위한 첨가제로서 본 발명자들은 요소와 이미다졸 환 함유 화합물을 하나 이상을 첨가하는 것이 바람직하다는 것을 발견하였다.

이미다졸 환-함유 화합물로서, 이미다졸, 히스티딘, 이미다졸마크릴산, 이미다졸카르복시알데하이드, 이미다졸카르복스아미드, 이미다졸디온, 이미다졸디티오카르복실산, 이미다졸디카르복실산, 이미다졸메탄올,

이미다졸리딘티온, 이미다졸리돈, 히스타민, 이미다조피리미딘 등이 언급될 수 있다.

인돌 환합유 화합물로서 트립토판, 인돌아크릴산, 인돌, 인돌아세트산, 인돌아세트 하이드라자이드, 인돌 아세트 메틸 에스테르, 인돌부틸산, 인돌아세토니트릴, 인돌카르비놀, 인돌카르복스일데하이드, 인돌카르복실산, 인돌에탄올, 인돌아세트산, 인돌메탄올, 인돌프로파온산, 인돌파루보산, 인돌릴 메틸 케톤, 인돌 마이신, 인돌아세톤, 인도메타신, 인도프로펜, 인도라민, 등이 언급될 수 있다.

첨가량은 요소의 경우 0.5M 내지 5M, 인돌아크릴산의 경우 5mM 내지 50mM, 기타 첨가제의 경우 0.05M 내지 0.5M이다.

한편, HCV 피복 단백질과 같은 막 단백질은 이들이 궁극적으로 처리되지 않는다면 자발적으로 용해되지 않는다. 소수성 부분을 가진 단백질을 수중에 용해시키기 위해서 소수성 부분을 계면활성제로 친수성 부분으로 전환시키는 방법이 잘 알려져 있다. 그러나, 구아니딘 클로라이드와 같은 특정 염은 무반응성 단백질을 수용성으로 만들어 주는 성질을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 특성을 갖고 있는 염(카오트로픽제: chaotropic agents)으로부터 생성된 미온은 카오트로픽 미온이라하여 음이온성 미온으로서 구아니딘 미온, 티오시마네이트 미온, 요오드 미온, 과요오드산 미온, 과염소산 미온 등이 알려져 있다. 미들 미온을 형성하는 염이 무반응성 단백질의 가용화를 위해 사용되었다. 카오트로픽 미온은 바이러스 입자로부터 항원을 효율적으로 방출하는 작용을 하는 것으로 기대되었다.

그러나, 카오트로픽 미온이 첨가될 때, 단백질의 이차 구조가 붕괴되며 결국 에피토프 구조가 파괴된다. 따라서, 항체와 같은 탐침이 카오트로픽 미온의 존재하에서 면역 복합체 형성 반응을 위해 첨가될 때 항체 와의 결합은 약화되고 민감성은 감소되어 심각한 문제를 야기하는 것으로 생각된다.

한편, 카오트로픽 미온의 변성 효과는 대부분 가역적이며 따라서 투석 또는 화석에 의해 미온 세기를 약화 시킬 때 변성된 구조는 본래의 구조로 일시 회복된다. 이것은 카오트로픽 미온과 같은 처리제의 사용과 관련하여 또 다른 문제를 초래한다. 즉, 본 발명의 목적하는 처리 방법에 따르면, 샘플에 존재하는 바이러스 입자는 효율적으로 방출될 뿐만 아니라 샘플에 존재하는 항원에 결합하는 고 친화성 항체가 동시에 불활성화되어야 한다. 그러므로, 카오트로픽 미온으로의 가용화는 샘플에 존재하는 고 친화성 항체의 적절한 불활성화를 제공하지 못하여 항체는 민감성을 저해하는 것으로 믿어진다.

따라서, 카오트로픽 미온을 사용하는 처리 방법은 두 가지 문제에 직면해 있다. 카오트로픽 미온이 구조를 파괴할 수 있는 조건에서 항원-항체 반응이 억제되는 한편 카오트로픽 미온 단독에 의한 효과는 샘플에서의 반응을 방해하는 항체를 불활성화하기에 충분하지 않으며, 항원-항체 반응이 억제되지 않는 조건에서는 항체의 오염이 반응을 억제할 수 있다.

이러한 당면 문제를 해결하기 위하여 항원의 에피토프가 가역적으로 파괴되고 샘플내 오염 항체의 기능이 비가역적으로 파괴되는 조건을 찾는 것이 필요하다.

항체가 불활성화되는 조건에 대하여 알카리 처리, 산 처리 등이 알려져 있다. 혈청의 산 처리는 가양성 결과를 발생할 수 있는데 그 이유는 그 처리가 혈청 단백질의 일부를 비가역적으로 변성시켜 샘플의 처리 후 대부분의 경우 피펫팅을 방해하는 침전물을 형성하고 변성된 단백질을 함입하고 있는 침전물이 충분히 고체상에 흡수되어 밀도로서 검출될 수 있기 때문이다. 또 다른 문제로서, 해당 항원이 비특이적으로 침전물에 함입될 때 텁텁과 반응하는 항원의 양은 감소하여 결국 민감성의 감소가 초래된다.

본 발명자들은 구아니딘 처리와 혼용된 산 처리로서 침전을 형성과 같은 산 처리와 관련된 문제점과 구아니딘 처리와 연관된 당면 문제를 해결할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다. 또한, 본 발명자들은 구아니딘과 같은 카오트로픽 미온과 산성화제를 포함한 처리제에 계면활성제를 첨가하는 것이 바람직함을 발견하였다. 산성화제로서는 염산, 황산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리클로로아세트산 등이 바람직하다.

계면활성제로서는 양쪽성 계면활성제, 예를 들면 CHAPS (3-[3-(3-클라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트), CHAPSO (3-[3-(클라미도프로필)디메틸암모니오]-2-하이드록시-1-프로판설포네이트), 도데실-N-베타민, 3-(도데실디메틸암모니오)-1-프로파설포네이트, 음이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐 에테르(예, 트리톤 X100), 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르(예, NP 40), 폴리옥시에틸렌 슬리톨 에스테르(예, 트윈 20), 폴리옥시에틸렌 도데실 에테르(예, Brij 58) 및 옥틸 글루코시드가 바람직하다. 또한, 고도의 단백질 구조를 수소 이온 결합을 약화시킴으로써 부분적으로 파괴하는 요소와 같은 물질이 첨가될 수 있다.

특히, 2M 이상의 구아니딘 하이드로클로라이드, 2% 이상의 트리톤 X100 및 0.02% 이상의 트윈 20을 4°C 내지 45°C의 온도에서 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

어떠한 양태에서도, 바이러스 항원은 본 발명의 처리 방법을 사용함으로써 HCV 또는 HBV와 유사한 구조를 갖는 바이러스 입자를 함유한 샘플로부터 탐침의 형태, 즉 탐침으로서 항체를 사용하는 소위 면역검정에 적합한 상태로 방출시킬 수 있음이 명백하다. 본원에서 사용된 HCV 또는 HBV와 구조가 유사한 바이러스는 게놈 RNA 또는 DNA가 단백질로 팩킹되어 있고 이를 막 단백질 또는 지질 막이 에워싸고 있는 구조를 갖는 바이러스 입자를 형성하는 바이러스이다. 이러한 바이러스의 예로는 HCV와 연관된 폴리비바이러스, 사람 면역결핍바이러스(HIV)와 같은 레트로바이러스 등이 포함된다. 또한, HBV와 같이 게놈으로서 DNA를 갖는 바이러스가 구조적으로 유사할 때 그에 포함된다.

바이러스 항원의 노출

장복기 동안에 수거된 샘플에서 바이러스 항원을 검출하는 방법에 관한 본 발명의 두 번째 양태에 따르면, 바이러스 항원에 대한 항체가 형성되어 있지 않으며 그럼으로써 바이러스 항원을 노출시키기 위해 바이러스 입자를 분쇄하는 것으로 충분하며 샘플에 존재하는 항체를 파괴할 필요가 없다. 따라서, 상가된 샘플의 예비처리는 필요치 않으며 바이러스 입자를 노출시키는 바이러스 입자-분쇄 물질의 존재로 충분하다. 특히, 바이러스 입자-분쇄 물질은 바이러스 입자에 존재하는 바이러스 항원을 위해 필수적이다.

바이러스 입자는 일반적으로 게놈으로서 핵산과 코어 항원이 복합체를 형성하여 입자를 형성하고 입자는

지질 막과 외막 단백질을 포함한 피복물에 의해 코팅되어 있는 구조를 하고 있는 것으로 믿어진다. 또한, 혈중에서 바이러스 입자는 서릴도 지단백질, 바이러스에 대한 항체 등과의 복합체 형태로 존재하는 것으로 믿고 있다. 따라서, 탐침은 바이러스 항원, 특히 혈중에 존재하는 입자내 항원을 인식하거나 그에 결합할 수 없다. 그러므로, 바이러스 항원을 검출하기 위하여 예를 들면 바이러스 입자가 탐침에 의해 인지될 수 있도록 바이러스 입자를 처리하여 바이러스 입자를 에워싸고 있는 구조를 제거해야 한다.

따라서, 본 발명은 또한 바이러스 입자를 인식하는 탐침에 의해 인식되도록 샘플에 함유된 바이러스 입자 내 바이러스 항원을 노출시켜 주는 반응 조건, 그 반응을 수행하는 시스템을 포함한 반응의 방법 및 그 반응을 수행하는 시스템을 함유한 시약을 제공한다.

본 발명에 의해 제공된 시스템에서 항원 검출을 위해 적합한 반응계는 바이러스 항원의 에피토프에 대한 항체의 기능을 유지하기에 충분할 만큼 온화하고 샘플에 존재하는 복잡한 구조인 바이러스 입자로부터 바이러스 항원-인식 탐침인 항체에 의해 인식된 면적을 완전히 노출시킬 수 있는 조건을 포함한다.

HCV의 경우, 코어 항원은 초원심분리에 의해 분리된 바이러스 입자를 처리함으로써 검출할 수 있으며 (Takahashi et al., 1992, J. Gen. Virol., 73: 667-672) HCV 입자는 트윈 80 또는 트리톤 X100과 같은 비미온성 계면활성제를 사용하여 폴리에틸렌 글리콜로 응집시켜 첨전시킬 수 있음이 이미 입증되었다 (Kashiwakuma et al., 1996, J. Immunological Methods, 190: 79-89). 그러나, 전자의 경우, 검출 민감성이 충분치 않으며 항원이 완전히 노출되는지에 관한 의문이 남아있다. 후자의 경우엔, 다른 처리제의 첨가에 의해 항체가 불활성화되었고 계면활성제 자체의 영향에 대하여는 어떠한 언급도 없다.

본 발명에 따라 우선적으로 계면활성제를 중심으로 조건이 연구되었다. 그 결과 계면활성제를 기본으로 한 조성물을 사용함으로써 원심분리나 가열과 같은 예비처리의 절차를 실시하지 않고서 단지 반응용액에 샘플을 희석시킴으로써 바이러스 입자내 항원의 효율적인 검출을 얻을 수 있음을 발견하였다.

바이러스 입자로부터 바이러스 항원을 효과적으로 추출하고 혈청내 다양한 물질과의 상호작용을 억제하며 그럼으로써 탐침이 항원과 효율적으로 반응할 수 있는 조건을 제공하는 것이 필요하다. 이 경우에 사용된 효과적인 계면활성제로서 한 분자내에 10개 이상의 탄소를 갖는 알킬 라디칼과 미차, 삼차 또는 사차 아민을 갖는 계면활성제 또는 음이온성 계면활성제가 언급될 수 있다.

알킬 라디칼과 미차, 삼차 또는 사차 아민을 갖는 계면활성제에 있어서, 알킬기는 직쇄 알킬기가 바람직하고 탄소원자 수는 10 이상이 바람직하고 더욱 바람직하게는 10 내지 20이다. 아민으로서는 삼차 또는 사차 아민(암모늄)이 바람직하다.

특정 계면활성제로는 도데실-N-사르코신산, 도데실 트리메틸 암모늄, 세틸트리메틸 암모늄, 3-(도데실디메틸암모니오)-1-프로판 설포네이트, 3-(테트라데실디메틸암모니오)-1-프로판 설포네이트, 도데실 피리디늄, 세틸 피리디늄, 데카노일-N-메틸 글루카미드 (MEGA-10), 도데실-N-베타인 등이 포함된다. 바람직한 것은 도데실-N-사르코신 산 및 도데실 트리메틸 암모늄이다.

상기 언급된 비미온성 계면활성제로서, 친수천 유기 평형이 12 내지 14인 것이 바람직하며 트리톤 X100 및 트리톤 X114와 같은 폴리옥시에틸렌 이소옥틸페닐에테르 또는 노니데트 P40, 트리톤 N101 및 니클 NP와 같은 폴리옥시에틸렌 노닐페닐에테르가 바람직하다.

본 발명에 따르면, 상기 두 유형의 계면활성제는 단독으로 사용될 수 있으나 이를 혼합하여 사용하는 것은 더욱 바람직하며 상승 효과도 얻을 수 있다.

요소와 같이 수성 환경을 변화시키는 추가의 성분이 첨가될 수 있다.

본 발명에서 탐침으로서의 모노클로날 항체

본원에 사용된 HCV의 구조 단백질의 유전자 단편은 적어도 HCV의 N-말단으로부터 1 내지 160번의 아미노산 서열을 함유한 폴리펩타이드의 암호화 염기 서열을 갖는 DNA 단편과 HCV의 구조 단백질의 코어 영역을 할 유한 유전자 단편을 의미한다. 특정적으로, 본 단편은 서열 2의 아미노산 서열을 암호화한 염기서열을 포함한 유전자 단편이다.

본원에 사용된 HCV 항원의 활성을 갖는 폴리펩타이드는 항-HCV 항체와 면역학적으로 반응하는 융합 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미하며 하이브리도마를 작제하고 미로부터 얻은 본 발명의 모노클로날 항체를 위한 항원으로서 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 폴리펩타이드는 서열 1의 아미노산 서열을 포함한 HCV 항원의 활성을 갖는 폴리펩타이드 또는 서열 1의 아미노산 서열의 일부를 포함한 HCV 항원의 활성을 갖는 폴리펩타이드 또는 N-말단 또는 C-말단에 연결된 추가의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이다.

서열 3 내지 6에 기술된 아미노산 서열을 갖는 상기 융합 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드에 대한 본 발명의 모노클로날 항체는 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 하이브리도마에 의한 모노클로날 항체의 제조는 잘 알려져 있다. 예를 들면, 상기 언급된 융합 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 (이하, 본 발명 항원이라 한다)를 단독 항원으로서 또는 BSA, KLH 등과 혼합된 항원으로서 단독으로 또는 보조제(예, 프로인트 완성 보조제)와의 혼합물로 복강내 또는 피하로 투여하여 BALB/c 마우스를 주기적으로 면역화할 수 있다. 혈청내 항체 역기가 증가했을 때 본 발명의 항원을 부스터로서 꼬리 정맥에 투여한다. 비장을 무균적 으로 불리한 후 이를 적합한 골수층 세포주와 융합시켜 하이브리도를 얻는다. 이 방법은 켈러와 밀스턴의 방법 (Nature 256: 495-497, 1975)에 따라 수행할 수 있다.

상기 방법에 의해 수득된 하이브리도마 세포주는 적당한 배양액에서 배양할 수 있으며 본 발명의 항원에 대해 특이적인 반응을 나타내는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 선별하고 클로닝한다. 항체-생성 하이브리도마의 클로닝을 위해 제한 히석 방법외에 면질 한천 방법(Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)을 사용할 수 있다. 이에 따라 생성된 모노클로날 항체는 단백질 A를 사용한 커럼 크로마토그래피와 같은 방법으로 정제한다.

상기 모노클로날 항체이외에 탐침으로서 사용된 분자를 형성할 수 있다. 예를 들면, 재조합 항체가 후진 분에 의해 상세히 기술되었다(Trends in Biotechnology, 15: 62-70, 1997).

탐침을 사용한 검출 시스템

본 발명에 따라 생성된 모노클로날 항체는 호소-연결된 면역흡착 검정, 호소면역검정, 호소면역도트 검정, 방사성면역검정, 응집-기본 검정 또는 기타 널리 알려진 면역검정에서 HCV 구조 단백질의 검출 및 정량을 위한 시약으로서 사용한다. 표지 항체를 검출을 위해 사용할 때, 형광 화합물, 화학발광 화합물, 호소, 색원물질 등이 표지 화합물로서 사용할 수 있다.

예를 들면, 샘플내 바이러스 항원을 검출하기 위해 샌드위치 반응계-기본 방법을 사용한 경우, 사용될 진단 키트는 고체 지지체(예, 미소역가 웰의 내부벽)상에 피복된 하나 이상의 모노클로날 항체 또는 표지 물질에 결합된 하나 이상의 모노클로날 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 고체 지지체상에 고정된 모노클로날 항체와 표지 모노클로날 항체를 조합하여 사용할 수 있으며 고도의 민감성을 제공하는 조합이 선택될 수 있다.

사용될 수 있는 고체 지지체로는 예를 들면 폴리스티렌, 폴리카보네이트, 폴리프로필렌 또는 폴리비닐로 만든 미소역가 평판, 시험관 및 모세관, 비드(라텍스 비드, 적혈구 세포, 금속 화합물 등), 막(리포증 등), 필터 등이 포함된다.

발명의 효과

본 발명의 방법에 따르면, 탐침으로서 항체를 사용하여 검출하는 면역검정에 적합한 상태에서 바이러스 입자로부터 바이러스 항원을 용이하게 방출할 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 바이러스 입자를 험유한 샘플을 처리함으로써, 탐침으로서 항체 등을 사용하여 항원을 검출하는 면역검정에 의해 바이러스 항원의 간단하고 민감한 검출 및 정량을 달성할 수 있다. 또한, 본 발명의 샘플 처리 방법을 사용하는 면역검정을 이용하여 샘플내 바이러스의 유무를 결정하고 바이러스를 정량하는 키트, 검정 키트 및 진단시약을 만들 수 있다.

실시예

하기 실시예는 본 발명을 예시한다. 그러나, 이를 실시예가 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

실시예 1. HCV-유도된 폴리펩타이드의 발현 및 정제

(A) 밀현 플라스미드의 작제

HCV의 코어 영역에 상응하는 플라스미드를 다음과 같이 작제하였다. pUC 119내로 C11-C21 클론 및 C10-E12 클론(일본 미심사 특허 공개 번호 1994-38765)을 도입하여 각각 얻은 플라스미드 pUC C11-C21 및 pUC C10-E12의 DNA 각 1mg를 20μl의 제한효소 반응용액[50mM 트리스-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 1mM 디티오쓰레이톨, 100mM NaCl, 15 유니트의 EcoRI 및 15 유니트의 ClaI 효소] 및 제한효소 반응용액[10mM 트리스-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 1mM 디티오쓰레이톨, 50mM NaCl, 15 유니트의 ClaI 및 15 유니트의 KpnI 효소]으로 각각 1시간 동안 37°C에서 분해시킨 다음 0.8% 아가로즈 겔 전기영동하여 약 380 bp의 EcoRI-ClaI 단편과 약 920bp의 ClaI-KpnI 단편을 정제하였다.

pUC119를 EcoRI과 KpnI으로 분해시켜 얻은 두개의 DNA 단편과 벡터에 5μl의 10 × 리가제 완충용액[660mM 트리스-HCl, pH 7.5, 66mM MgCl₂, 100mM 디티오쓰레이톨, 1mM ATP], 1μl의 T4 리가제(350 유니트/μl) 및 둘을 첨가하여 총 용량을 50μl로 만든 다음 16°C에서 밤새 배양하여 연결반응을 실시하였다. 이 플라스미드로 M. 클라이 JM109를 형질전환시켜 플라스미드 pUC C21-E12를 수득하였다.

플라스미드 pUC C21-E12 DNA 1 나노그램에 대해 다음의 두 프라미대를 사용하여 PCR를 실시하였다: 5'-GAATTTCATGGCACGAACTCTAAA-3'(서열 7) 및 5'-TTAGTCCTCCAGAACCCGGAC-3'(서열 8). PCR은 GeneAmpTM(퍼킨 엘마 세투스사 제품 DNA 증폭 시약 키트)을 사용하여 95°C에서 1.5분 동안의 DNA 변성, 50°C에서 2분 동안의 어닐링, 70°C에서 3분 동안의 DNA 합성 조건 하에서 실시하였다. 이에 따라 수득된 DNA 단편은 0.8% 아가로즈 겔 전기영동하여 분리하고 글래스 파우더 방법(Gene Clean)으로 정제하였다.

한편, pUC 19를 SmaI으로 분해시키고 PCR에 의해 수득된 DNA 단편을 5μl의 10 × 리가제 완충용액[660mM 트리스-HCl, pH 7.5, 66mM MgCl₂, 100mM 디티오쓰레이톨, 1mM ATP], 1μl의 T4 리가제(350 유니트/μl) 및 둘에 첨가하여 총 용량을 50μl로 만든 다음 16°C에서 밤새 배양하여 연결반응을 실시하였다. 이 플라스미드로 M. 클라이 JM109를 형질전환시켜 플라스미드 pUC C21-E12 SmaI를 수득하였다. 이 플라스미드 DNA 1μg를 20μl의 제한효소 반응용액[150mM NaCl, 6mM 트리스-HCl, pH 7.5, 6mM MgCl₂, 15 유니트의 EcoRI 및 15 유니트의 BamHI 효소]에서 분해시킨 다음 0.8% 아가로즈 겔 전기영동하여 약 490bp의 EcoRI-BamHI 단편을 분리하고 이를 글래스 파우더 방법으로 정제하였다.

이어서, 1μg의 밀현 벡터 Trp Trp의 DNA(일본 미심사 특허 공개번호 1993-84085)를 20μl의 제한효소 반응용액[150mM NaCl, 6mM 트리스-HCl, pH 7.5, 6mM MgCl₂, 15 유니트의 EcoRI 및 15 유니트의 BamHI 효소]으로 37°C에서 1시간 동안 분해시켰다. 반응용액에 39μl의 둘을 첨가한 다음 70°C로 5분 동안 가열하였다. 그런 후 1μl의 세균성 알카리성 포스파타제(BAP)를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다.

폐늘 추출을 위해 반응 혼합물에 폐늘을 첨가하였다. 이에 따라 수득된 수성 총을 에탄올로 첨전시키고 형성된 첨전물을 건조시켰다. 수득된 EcoRI-BamHI-처리된 벡터 DNA 1μg와 살기 코어 140 단편을 5μl의 10 × 리가제 완충용액[660mM 트리스-HCl, pH 7.5, 66mM MgCl₂, 100mM 디티오쓰레이톨, 1mM ATP], 1μl의 T4 리가제(350 유니트/μl) 및 둘에 첨가하여 총 용량을 50μl로 만든 다음 16°C에서 밤새 배양하여 연결반응을 실시하였다.

살기 반응 혼합물 10μl를 사용하여 M. 클라이 HB101을 형질전환하였다. 형질전환을 위해 사용된 민감성이 M. 클라이 균주는 염화칼슘 방법[Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159-162 (1970)]에 의

해 작제할 수 있다. 혈질전환된 미. 클라이를 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 앰피실린이 함유된 LB 평판(1% 트립토판, 0.5% NaCl, 1.5% 한천)상에 도말하고 37°C에서 밤새 배양하였다. 배양 투프를 사용하여 평판상에 형성된 세균 클로니 1 투프를 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 앰피실린이 함유된 LB 배양배지로 옮기고 37°C에서 밤새 배양하였다. 1.5mℓ의 세균 배양물을 원심분리하여 세포를 수거한 다음 플라스미드 DNA를 알카리 방법(Marmiatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982))으로 소제조에 적용하였다.

그런후 상기 제조된 플라스미드 DNA $1\mu\text{g}$ 을 $20\mu\text{l}$ 의 제한효소 반응용액[150mM NaCl , 6mM 트리스-HCl, pH 7.5, 6mM MgCl_2 , 15 유니트의 EcoRI 및 15 유니트의 BamHI 효소]으로 37°C에서 1시간 동안 분해시킨 다음 아가로즈 젤 전기영동을 하였다. 약 490bp의 EcoRI-BamHI 단편을 생성한 Trp TrpE 코어 160 발현 플라스미드를 선별하였다.

(8) 클론 코어 160에 암호화된 폴리펩타이드의 발현 및 정제

발현 플라스미드 Trp TrpE 코어 160을 가진 미. 클라이 HB101를 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린이 함유된 3mM 의 2YT 배지(1.6% 트립토, 1% 효모추출물, 0.5% NaCl)에 접종하고 37°C에서 9시간 동안 배양하였다. 1mM 의 배양물을 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 앰피실린이 함유된 100mM 의 M9-CA 배지(0.6% Na_2HPO_4 , 0.5% KH_2PO_4 , 0.5% NaCl, 0.1% NH_4Cl , 0.1 mM CaCl_2 , 2mM MgSO_4 , 0.5% 카사미노산, 0.2% 글루코즈)에 옮기고 37°C에서 배양하였다. 인돌 아크릴레이트를 OD600 = 0.3에서 $40\mu\text{g}/\text{l}$ 의 최증 농도로 첨가하고 16시간 이상 배양하였다. 배양물을 원심분리하여 세포를 수거하였다.

세포에 20mM 의 완충액 A[50mM 트리스-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA , 30mM NaCl]를 첨가하여 현탁시켰다. 이 현탁액을 원심분리하여 2.6g 의 발현세포를 수득하였다. 이에 따라 얇은 세포를 10mM 의 완충액 A에 현탁시켰다. 이 미. 클라이의 약을 음파로 분쇄시킨 후 원심분리하여 HCV cDNA와 TrpE에 의해 암호화된 융합 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드를 함유한 불용성 분획을 수득하였다. 분획에 6M 요소가 함유된 완충액 A 10mL 를 첨가하여 융합 폴리펩타이드를 용해시키고 추출하였다. 용해된 추출물을 S-세파로즈를 사용하여 이온교환 컬럼 크로마토그래피하여 융합 폴리펩타이드를 정제하였다.

실시예 2. 하이브리도마의 작제방법

상기 방법에 의해 제조된 융합 폴리펩타이드(TrpC11)를 6M 요소중에 용해시킨 다음 0.15M NaCl 이 함유된 10mM 인산염 완충액(pH 7.3)중에 회색시켜 최증 농도 0.2 내지 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ 로 만들고 등량의 부형제(Titermax)와 혼합하여 TrpC11 현탁액을 만들었다. TrpC11의 0.1 내지 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 로 제조된 미. 현탁액을 생후 4 내지 6주된 BALB/c 마우스에 복강내 투여하였다. 유사한 면역화를 2주마다 실시하고 추가로 약 2주가 지나서 생리 삭약수증에 용해된 $10\mu\text{g}$ 의 TrpC11을 꼬리 정맥으로 투여하였다.

마지막 접종후 3일 경과하여, 비장을 면역화 등을로부터 무균적으로 분리하고 가위로 세편한 다음 개개의 세포로 분쇄하고 RPMI-1640 배지로 3회 세척하였다. 세척후, 2.56×10^7 세포를 대수성장기에 있는 마우스 골수증 세포주 SP2/0Ag14와 1.64×10^9 비장세포와 50mL 원심분리관에서 혼합하였다. 혼합물을 $200 \times g$ 로 5분 동안 원심분리하고 상등물을 제거한 다음 첨전률에 50% 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 4000(마크사 제품)이 함유된 RPMI-1640 배지 1mL 를 첨가하고 추가로 10mL 의 RPMI-1640 배지를 첨가하여 세포 융합을 실시하였다.

PEG를 원심분리($200 \times g$, 5분)하여 제거한 후, 융합된 세포를 96-웰 평판에 10% 소혈청, 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘(이하 HAT라 한다)이 함유된 RPMI1640에서 약 10일간 배양하여 단지 하이브리도마만을 성장시켰다. 그런후, 원하는 항체를 생성하는 클론을 ELISA 방법으로 검출하여 본 발명의 목적하는 반응 특이성을 갖는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마를 수득하였다.

이에 따라 수득된 하이브리도마를 통상적인 제한 회색 방법에 따라 모노클로날하고 수득된 하이브리도마를 HC11-11, HC11-14, HC11-10, HC11-3 및 HC11-7로 명명하였다. 이를 4종의 하이브리도마는 통상산업성공업 기술원생명공학연구소(the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology)에 1997년 7월 4일에 기록되었으며 각각 기록번호 FERM BP-6005, FERM BP-6006, FERM BP-6004, FERM BP-6002 및 FERM BP-6003를 부여받았다.

실시예 3. 모노클로날 항체의 작제

실시예 2의 방법에서 수득된 하이브리도마를 프리스탄 등으로 처리된 마우스의 복강에 접종하고 복수액에 생성된 모노클로날 항체를 수거하였다. 프로테인 A-결합된 세파로즈 컬럼을 사용하여 모노클로날 항체를 정제하여 IgG 분획을 분리하였다.

도끼 항-마우스 Ig 미소타입 항체(지메드사 제품)를 사용한 면역검정에 의해 상기 5종 하이브리도마로부터 생성된 모노클로날 항체 C11-14, C11-11, C11-10, C11-7 및 C11-3 각각의 미소타입은 C11-10 및 C11-7의 경우 IgG2D1과 CH11-11, C11-14 및 C11-3의 경우 IgG1인 것으로 밝혀졌다. 수득된 5종 모노클로날 항체에 대해, HCV 코어 영역으로부터 유래된 서열에 따라 합성된 20개 아미노산으로 구성된 합성 펩타이드를 사용하여 에피토프 분석을 실시하였다. 하기 표 10에 나타낸 미의 결과는 그들이 코어 영역의 일부를 특이적으로 인식하는 모노클로날 항체임을 가리킨다.

[표 1]

항체	인식부위
C11-14	⁴¹ Gly- ⁵⁰ Arg (서열 4)
C11-10	²¹ Asp- ⁴⁰ Arg (서열 3)
C11-3	¹⁰⁰ Pro- ¹²⁰ Gly (서열 5)
C11-7	¹¹¹ Asp- ¹³⁰ Phe (서열 6)
C11-11	¹⁰⁰ Pro- ¹²⁰ Gly (서열 5)

실시예 4. 샘플 처리 조건에 대한 연구

1) SDS 농도

100μg의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 상이한 농도의 SDS와 0.6% CHAPS가 함유된 처리용액 100μl을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 56°C의 배양기 세트에 넣고 30분간 처리한 다음 각 80μl의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 처리 시간에 따른 SDS 농도로서도 1에 나타나 있다.

2) CHAPS 농도

100μg의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 상이한 농도의 CHAPS와 5% SDS가 함유된 처리용액 100μl을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 56°C의 배양기 세트에 넣고 30분간 처리한 다음 각 80μl의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 처리 시간에 따른 CHAPS 농도로서도 2에 나타나 있다.

3) 요소 농도

100μg의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 상이한 농도의 요소가 함유된 처리용액(5% SDS, 0.5% CHAPS) 100μl을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 56°C의 배양기 세트에 넣고 30분간 처리한 다음 각 80μl의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 처리 시간에 따른 SDS 농도로서도 3에 나타나 있다.

4) 트리톤 X100 농도

100μg의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 상이한 농도의 트리톤 X100이 함유된 처리용액(5% SDS, 0.6% CHAPS, 6M 요소) 100μl을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 56°C의 배양기 세트에 넣고 30분간 처리한 다음 각 80μl의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 처리 시간에 대한 트리톤 X100 농도로서도 4에 횡선좌표로 나타나 있다.

5) 반응 온도

100μg의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 100μl의 처리용액(5% SDS, 0.6% CHAPS, 6M 요소, 0.75% 트리톤 X100)을 첨가하였다. 혼합물을 4°C, 실온(23°C), 37°C, 45°C, 56°C 및 70°C에서 30분 동안 처리하고 각각 80μl의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 도 5에 나타나 있다.

검정 방법

혈청 처리의 조건에 대한 연구에서 얻은 샘플을 하기된 개개의 검정 방법을 사용하여 평가하였다. 따라서, 항-HCV 코어 항원 모노클로날 항체(동량의 항체 C11-3 및 C11-7의 혼합물)를 0.1M 탄산염 완충액(pH 9.6)중에 6μg/ml의 최종 농도로 희석하고 100μl의 각 희석액을 96-웰 미소역가 평판(누크사 제품)의 각 웰에 분산시켰다. 평판을 4°C에서 밤새 배양한 후 0.15M NaCl이 함유된 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.3) 0.35ml로 2회 세척하였다. 그런 다음, 0.5% 카세인-Na이 함유된 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.35) 0.35ml(미하 차단용액이라 한다)를 첨가하고 평판을 실온에서 2시간 더 배양하였다.

차단용액을 제거한 후, 0.15M NaCl, 1% BSA, 0.5% 카세인-Na 및 0.05% 트윈 20이 함유된 100mM 인산나트륨 완충액(pH 7.3) 160μl와 혈청 처리 방법에 의해 얻은 측정을 위한 샘플을 개개의 웰에 첨가하였다. 이어서, 평판을 실온에서 2시간 동안 배양하고 300μl의 세척액으로 5회 세척하였다. 계속해서, 100μl의 퍼올리시다제(POD)-표지된 모노클로날 항체(동량의 C11-10과 C11-14의 혼합물)를 첨가하고 실온에서 30분 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 평판을 300μl의 삼기 세척액으로 5회 세척하였다. 평판에 100μl의 기질(오르토-페닐렌디아민, 미하 POD라 한다) 용액을 첨가하고 평판을 실온에서 30분 동안 배양한 후 100μl의 2N 황산 용액을 첨가하였다. 630nm에서의 흡광도를 참조로 하여 흡광도를 492nm(OD492)의 표준에서 측정하였다.

도 1 내지 도 4에서 보는 바와 같이 각각의 처리 조건은 최적화되었다. 미처리된 샘플에서 코어 항원을 검출하는 것은 어려웠으나 이러한 간단한 처리는 코어 항원의 검출을 가능하게 하였다. 특히, 0.5% 이상의 SDS, 0.1% 이상의 CHAPS, 1M 이상의 요소 및 0.1% 내지 0.75%의 트리톤 X100과 4°C 내지 70°C의 온도 범위를 사용함으로써 코어 항원을 만족스럽게 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

실시예 5. 구조 영역에서 코어 항원의 검출 및 측정 방법(1)

100 μ l의 혈청에 100 μ l의 처리용액(5% SDS, 0.6% CHAPS, 6M 요소, 0.75% 트리톤 X100)을 첨가하였다. 이 것을 56°C의 배양기 세트에 넣은 후 30분 동안 처리하고 120 μ l의 처리 혼합물을 샘플로서 사용하였다.

HCV 코어 항원 모노클로날 항체(동량의 C11-3과 C11-7의 혼합물)를 0.1M 단산염 완충액(pH 9.6)중에 6 μ g/ml의 최종 총 농도로 희석하고 100 μ l의 각 희석된 혼합물을 96-웰 미소역가 평판(눈크사 제품)의 각 웰에 분산시켰다. 평판을 4°C에서 밤새 배양하고 0.15M NaClO이 함유된 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.3) 0.35ml로 2회 세척하였다. 이어서, 0.35ml의 차단용액을 첨가하고 평판을 실온에서 2시간 배양하였다.

차단용액을 제거한 후 120 μ l의 반응 완충액과 살기 처리방법에서 얻은 측정을 위한 샘플을 개개의 웰내로 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 평판을 300 μ l의 세척액으로 5회 세척한 다음 100 μ l의 퍼옥시다제(POD)-표지된 모노클로날 항체(동량의 C11-10와 C11-14의 혼합물)를 평판에 첨가하고 평판을 실온에서 30분 동안 배양하였다. 평판을 300 μ l의 세척액으로 5회 세척하고 100 μ l의 기질(OPD) 용액을 첨가한 다음 실온에서 45분 동안 배양한 후 100 μ l의 2N 활산용액을 첨가하였다. 630nm에서의 흡광도를 참조로 하여 흡광도를 492nm(00492)의 표정으로서 측정하였다. 표준 혈청으로서 1U/ml로서 정의된 패널 혈청 50을 1% BSA 가 함유된 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.3)에 연속적으로 희석한 후 유사하게 처리하고 측정하였다.

도 6은 표준 혈청으로서 사용된 패널 혈청 50의 희석 라인을 보여준다. 샘플내 코어 항원은 용량-의존 방식으로 측정되었으며 약 0.5U/ml의 수준으로 검출될 수 있었다. 따라서, 아주 간단한 샘플 처리 방법을 본 발명의 모노클로날 항체와 조합함으로써 HCV 코어 항원을 검출 또는 정량할 수 있음이 입증되었다.

실시예 6. HCV 코어 항원의 검출 및 정량(2)

알카리성 포스파타제-표지 모노클로날 항체를 사용한 방법

고체 캐리어로서 96-웰 블랙 미소역가 평판(눈크사 제품)를, 표지 항체로서 알카리성 포스파타제-표지 모노클로날 항체를, 기질로서 CDPstar(감작제로서 에메랄드 11)를 사용하였다. 표준 혈청으로서 사용된 패널 혈청 50의 희석 라인이 도 7에 나타나 있다. 샘플내 코어 항원은 용량-의존적 방식으로 측정되었고 약 0.5U/ml의 수준으로 검출될 수 있었다. 따라서, 알카리성 포스파타제-표지 모노클로날 항체를 사용한 방법이 HCV 코어 항원도 검출 또는 정량할 수 있음이 입증되었다.

실시예 7. 용혈된 혈청의 민감성 감소를 억제하기 위한 첨가제에 관한 연구

혈청 성분이 민감성에 미치는 영향을 시험하였을 때 헤모글로빈의 첨가가 민감성을 현저히 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 이 감소는 SDS, CHAPS 또는 트리톤 X100가 함유된 예비처리제를 사용한 예비처리에 의해 생성된 변성된 헤모글로빈으로부터 방출된 헬에 의해 야기된 것으로 여겨졌다. 따라서, 변성된 헤모글로빈의 효과를 감소시킬 수 있었던 첨가제는 이를 예비처리제에 첨가함으로써 시험되었다.

요소 첨가의 영향은 HCV 코어 항원 양성 혈청(패널 혈청 3번)에 고농도의 헤모글로빈(고쿠사이 시마쿠사 제품)을 첨가하여 형성된 모델 샘플에 요소를 첨가함으로써 및 실시예 6에 따라 코어 항원을 측정함으로써 연구하였다. 대조로서 사용된 헤모글로빈 무첨가 그룹의 100%에 대한 상대비율로서 430mg/dl 헤모글로빈 첨가 그룹에서의 코어 항원의 활성 수준이 표 2에 나타나 있다. 요소가 첨가되지 않은 경우 헤모글로빈 첨가 그룹에서 코어 항원의 활성 수분은 30%까지 감소하였으나 요소의 첨가량을 증가시킴으로써 헤모글로빈 첨가 그룹에서의 코어 항원의 활성 수분은 증가하고 헤모글로빈에 의한 저해는 감소하였다.

[표 2]

헤모글로빈에 의한 저해에 미치는 요소의 억제 효과

첨가제	대조군에 대한 상대비(%)
무첨가	30.0
0.5M 요소	36.3
1M 요소	39.7
2M 요소	43.0
3M 요소	48.8
4M 요소	53.7

한편, 헬과 각 아미노산과의 상호작용 가능성과 아미노기와 카르복실기에 의한 완충효과가 있기 때문에 여러 가지 아미노산을 첨가하고 이를의 효과 정도를 검사하였다. 이의 결과는 표 3에 나타나 있다.

(표 3)

헤모글로빈에 의한 저해에 미치는 여러 가지·아미노산의 억제 효과

첨가제	대조군에 대한 살내비(%)
무첨가	22.7
0.1M 히스티딘	53.7
0.1M 트립토판	70.8
0.1M 페닐알라닌	45.8
0.1M 무이신	25.9
0.1M 글루타민	36.1
0.1M 라이신	42.1
0.1M 아르기닌	31.4
0.1M 글루탐산	49.8
0.1M 글라이신	39.1
0.1M 프롤린	31.2
0.1M 세린	32.5

트립토판과 히스티딘은 저해에 가장 강력한 억제 효과를 나타냈다. 저해에 대한 억제 효과의 용량-의존성을 연구하였으며 이의 결과는 표 4에 나타나 있다.

(표 4)

헤모글로빈에 의한 저해에 미치는 히스티딘과 트립토판의 억제 효과

첨가제	대조군에 대한 살내비(%)
무첨가	24.2
0.05M 히스티딘	49.3
0.1M 히스티딘	59.4
0.15M 히스티딘	74.5
0.2M 히스티딘	77.0
0.05M 트립토판	58.7
0.1M 트립토판	71.5
0.15M 트립토판	77.9
0.2M 트립토판	89.0

이 효과는 헬이 헤모글로빈내 촉색에 의해 배위되어 있기 때문에 촉색에 기인하는 것으로 제안되었다. 따라서, 이미다졸, 히스티딘내 촉색, 인돌 환을 함유한 인돌아크릴산 및 트립토판내 촉색의 효과가 연구되었고 이의 결과는 표 5에 나타나 있다.

(표 5)

헤모글로빈에 의한 저해에 미치는 이미다졸과 인돌아크릴산의 억제 효과

첨가제	대조군에 대한 살내비(%)
무첨가	22.1
0.05M 이미다졸	35.2
0.1M 이미다졸	42.0
0.15M 이미다졸	58.8
0.2M 이미다졸	70.7
5mM 인돌아크릴산	50.4
10mM 인돌아크릴산	69.0
20mM 인돌아크릴산	90.3
30mM 인돌아크릴산	96.8

인돌 또는 인돌아크릴산이 반응에 첨가되었을 때 헤모글로빈에 의한 저해의 용량-의존성 억제 효과가 아미노산의 첨가에서와 마찬가지로 관찰되었다. 이것은 이미다졸 환을 함유한 물질(예, 히스티딘) 또는 인돌 환을 함유한 물질(예, 트립토판)을 반응에 첨가함으로써 헤모글로빈을 함유한 샘플에 대해서 조차도 고여

활원의 민감한 검출을 얻을 수 있음을 가리킨다.

상기 첨가제의 배합의 효과가 연구되었다. 이의 결과는 하기 표 8에 나타나 있다. 히스티딘과 트립토판을 배합함으로써 90% 이상의 회수를 얻었으며 요소의 첨가는 추가로 검출 민감성을 증가시켰다.

[표 8]

첨가제	대조군에 대한 상대비(%)
0.1M 히스티딘/0.1M 트립토판	91.1
4N 요소/0.1M 트리스/0.1M 히스티딘	112.6

실시예 8. 혈청 처리 및 검정 방법에서 인식된 분자 형태의 분석

각 혈청 처리 방법을 사용하여 0.25mL 의 패널 혈청 13을 처리하였다. 처리된 혈청을 젤 여과 컬럼 (Superdex 200HR, 1 x 30)에서 분별하고 분획내 항-코어 면역학적 활성을 측정하였다. 이 결과는 표 8에 나타나 있다. 본 도는 분자량이 약 20 내지 30kDa인 분자가 인식되고 있고 바이러스내 코어 항원이 상기 예비처리에 의한 혈청내 항-코어 항체의 불활성화 및 바이러스의 분쇄를 통해 방출되었음을 제시하였다.

실시예 9. 혈청에서 HCV 구조 영역내 코어 항원의 검정 방법

앰플리코어 HCV 모니터 키트(로슈사 제품)를 사용하여 10^4 내지 10^7 복제수/ mL 의 HCV-RNA를 갖는 것으로 측정된 혈청, PCR 방법 및 정상인 혈청을 사용하여 상기된 방법에 따라 혈청내 HCV 코어 항원을 정량하였다. 표준 혈청으로서 패널 혈청 50($1\text{U}/\text{mL}$ 로서 정의됨)를 1% BSA가 함유된 10mM 인산나트륨 완충액 ($\text{pH } 7.3$) 중에 연속적으로 희석하고 유사한 방식으로 처리하였다. 이의 결과는 표 7에 나타나 있다. 시험된 샘플중에서 모든 정상인 혈청내의 코어 항원은 검출 한계 미하였으며 모든 PCR-양성 샘플에서 검출될 수 있었다. 상호관계는 도 9에 나타나 있으며, PCR 방법과의 상호관계는 또한 0.8 이상인 것으로 나타났다.

[표 7]

HCV-RNA와 코어 항원의 수준

샘플 번호	RNA (K 복제수/ mL)	코어 항원 (mU/mL)
정상인 혈청	-	미검출
	-	미검출
패널 혈청	1.6	2.1
	8	2.1
	8	8.5
	16	3.7
	30	37.0
	87	266.7
	97	63.8
	170	116.1
	400	133.7
	1000	1000
	1300	277.3
	1600	1806

실시예 10. 샘플 처리 조건에 대한 연구

1) 구아니딘 하이드로클로라이드 농도

100 μL 의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 상이한 농도의 구아니딘 하이드로클로라이드와 0.5N HCl이 함유된 처리용액 100 μL 을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 실온에서 30분간 처리한 다음 각 80 μL 의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 처리 시간에 따른 구아니딘 하이드로클로라이드 농도로서도 10에 나타나 있다.

2) 트리톤 X100 농도

100 μL 의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 상이한 농도의 트리톤 X100(6M 구아니딘 하이드로클로라이드, 0.5N HCl)이 함유된 처리용액 100 μL 을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 실온에서 30분간 처리한 다음 각 80 μL 의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 처리 시간에 따

른 트리톤 X100 농도로서 도 11에 나타나 있다.

3) 트원 20 농도

100 μ 의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 삼이한 농도의 트리톤×100(6M 구아니딘 하이드로클로라이드, 0.5N HCl, 12.5% 트리톤 X100)이 함유된 처리용액 100 μ 을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 실온에서 30분 간 처리한 다음 각 80 μ 의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 처리 시간에 따른 트원 20 농도로서 도 12에 횡 좌표로 나타나 있다.

4) 반응 온도

100 μ 의 정상인 혈청과 HCV-RNA-양성 혈청에 100 μ 의 처리용액(6M 구아니딘 하이드로클로라이드, 0.5N HCl, 12.5% 트리톤 X100, 0.75% 트원 20)을 첨가하였다. 혼합물을 4°C, 37°C 및 45°C에서 30분 동안 처리하고 각각 80 μ 의 처리된 혼합물을 샘플로서 사용하였다. 하기된 검정 방법을 사용하여 수득된 결과는 도 13에 나타나 있다.

검정 방법

혈청 처리의 조건에 대한 연구에서 얻은 샘플을 하기된 개개의 검정 방법을 사용하여 평가하였다. 따라서, 항-HCV 코어 항원 모노클로날 항체(동량의 항체 C11-14와 C11-11의 혼합물)를 0.1M 탄산염 완충액(pH 9.6)중에 6 μ g/ml의 최종 총 농도로 희석하고 100 μ 의 각 희석액을 96-웰 미소역가 평판(눈크사 제품)의 각 웰에 분산시켰다. 평판을 4°C에서 밤새 배양한 후 0.15M NaCl이 함유된 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.3) 0.35ml로 2회 세척하였다. 그런 다음, 0.5% 카세인-Na이 함유된 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.35) 0.35ml(미하 차단용액이라 한다)를 첨가하고 평판을 실온에서 2시간 더 배양하였다.

차단용액을 제거한 후, 0.15M NaCl, 1% BSA, 0.5% 카세인-Na 및 0.05% 트원 20이 함유된 100mM 인산나트륨 완충액(pH 7.3) 140 μ 와 상기된 혈청 처리 방법에 의해 얻은 축정을 위한 샘플의 혼합물 160 μ 를 개개의 웰에 첨가하였다. 이어서, 평판을 실온에서 2시간 동안 배양하고 300 μ 의 세척액으로 5회 세척하였다. 계속해서, 100 μ 의 퍼옥시다제(POD)-표지된 모노클로날 항체(C11-10)를 첨가하고 실온에서 30분 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 평판을 300 μ 의 상기 세척액으로 5회 세척하였다. 평판에 100 μ 의 기질(오르토-페닐렌디아민, 미하 OPD라 한다) 용액을 첨가하고 평판을 실온에서 30분 동안 배양한 후 100 μ 의 2N 활산용액을 첨가하였다. 630nm에서의 흡광도를 참조로 하여 흡광도를 492nm(00492)의 파장에서 축정하였다.

도 10 내지 도 13에서 보는 바와 같이 각각의 처리 조건은 최적화되었다. 미처리된 샘플에서 코어 항원을 검출하는 것은 어려웠으나 간단한 처리는 코어 항원의 검출을 가능하게 하였다. 어떤 경우에서도 시그널의 증가는 건강한 사람에서는 관찰되지 않았다. 또한, 2M 이상의 구아니딘 하이드로클로라이드 및 0.2% 이상의 트리톤 X100과 4°C 내지 45°C의 온도 범위를 사용함으로써 코어 항원을 만족스럽게 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

실시예 11. 코어 항원의 검출 및 검정 방법

100 μ 의 혈청에 100 μ 의 처리용액(6M 구아니딘 하이드로클로라이드, 0.5N HCl, 12.5% 트리톤 X100, 0.75% 트원 20)을 첨가하였다. 이것을 실온에서 30분 동안 처리하고 100 μ 의 처리 혼합물을 샘플로서 사용하였다.

항-HCV 코어 항원 모노클로날 항체(동량의 C11-14와 C11-11의 혼합물)를 0.1M 탄산염 완충액(pH 9.6)중에 6 μ g/ml의 최종 총 농도로 희석하고 100 μ 의 각 희석된 혼합물을 96-웰 미소역가 평판(눈크사 제품)의 각 웰에 분산시켰다.

평판을 4°C에서 밤새 배양하고 0.15M NaCl이 함유된 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.3) 0.35ml로 2회 세척하였다. 이어서, 0.35ml의 차단용액을 첨가하고 평판을 실온에서 2시간 동안 정치해 두었다. 차단용액을 제거한 후 150 μ 의 반응 완충액과 상기 처리방법에서 얻은 축정을 위한 샘플을 개개의 웰내로 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다.

평판을 300 μ 의 세척액으로 5회 세척한 다음 100 μ 의 퍼옥시다제(POD)-표지된 모노클로날 항체(C11-10)를 평판에 첨가하고 평판을 실온에서 30분 동안 배양하였다. 평판을 300 μ 의 세척액으로 5회 세척하고 100 μ 의 기질(OPD) 용액을 첨가한 다음 실온에서 45분 동안 배양한 후 100 μ 의 2N 활산용액을 첨가하였다. 630nm에서의 흡광도를 참조로 하여 흡광도를 492nm(00492)의 파장에서 축정하였다. 표준 혈청으로서 1U/ml로서 정의된 패널 혈청 50을 1% BSA가 함유된 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.3)에 연속적으로 희석한 후 유사하게 처리하고 축정하였다.

도 14는 표준 혈청으로서 사용된 패널 혈청 50의 희석 라인을 보여준다. 샘플내 코어 항원은 용량-의존 방식으로 축정되었으며 약 0.5mU/ml 미하의 수준으로 검출될 수 있었다. 따라서, 아주 간단한 샘플 처리 방법을 본 발명의 모노클로날 항체와 조합함으로써 HCV 코어 항원을 검출 또는 정량할 수 있음이 입증되었다.

실시예 12. 혈청 처리 및 검정 방법에서 인식된 분자 형태의 분석

각 혈청 처리 방법을 사용하여 0.25ml의 패널 혈청 13을 처리하였다. 처리된 혈청을 젤 여과 커럼(Superdex 200HR, 1 x 30)에서 분별하고 분획내 항-코어 면역학적 활성을 축정하였다. 이 결과는 표 15에 나타나 있다. 본 도는 분자량이 약 20 내지 30kDa인 분자가 인식되고 있고 바이러스내 코어 항원이 상기 예비처리에 의한 혈청내 항-코어 항체의 불활성화 및 바이러스의 분쇄를 통해 방출되었음을 제시하였다.

실시예 13. 혈청에서 코어 항원의 검정 방법

엠플리코어 HCV 모니터 키트(로슈사 제품)을 사용하여 10^3 내지 10^7 복제수/ml의 HCV-RNA를 갖는 것으로 축정된 혈청, PCR 방법 및 정상인 혈청을 사용하여 상기된 방법에 따라 혈청내 HCV 코어 항원을 정량하였다.

표준 혈청으로서 패널 혈청 50(1U/ml로서 정의됨)을 1% BSA가 함유된 10mM 인산나트를 완충액(pH 7.3)중에 면속적으로 희석하고 유사한 방식으로 처리하였다. 이의 결과는 표 8에 나타나 있다. 시험된 샘플중에서 모든 정상인 혈청내의 코어 항원은 검출 한계 미하였으며 모든 PCR-양성 샘플에서 검출될 수 있었다. 상호관계는 도 16에 나타나 있으며, PCR 방법과의 상호관계는 또한 0.8 이상인 것으로 나타났다.

[표 8]

HCV-RNA와 코어 항원의 수준

샘플 번호	RNA (K 복제수/ml)	코어 항원 (mU/ml)
정상인 사람 혈청 1	-	미검출
정상인 사람 혈청 2	-	미검출
정상인 사람 혈청 3	-	미검출
정상인 사람 혈청 4	-	미검출
정상인 사람 혈청 5	-	미검출
정상인 사람 혈청 6	-	미검출
정상인 사람 혈청 7	-	미검출
패널 혈청 1	50	166.4
패널 혈청 7	830	471.1
패널 혈청 8	26	61.5
패널 혈청 11	240	107.4
패널 혈청 13	1600	1426
패널 혈청 15	25	40.1
패널 혈청 16	400	240.3
패널 혈청 19	840	1369
패널 혈청 26	87	1093
패널 혈청 31	30	45.8
패널 혈청 33	16	58.5
패널 혈청 39	97	89.0
패널 혈청 41	170	43.9
패널 혈청 44	180	57.5
패널 혈청 49	33	47.7
패널 혈청 50	1000	1005
패널 혈청 84	8.7	63.5

실시예 14. B형 간염 바이러스(HBV) 코어 항원의 검출

지금까지 HCV 코어 항원의 검출을 설명하였고 본 발명자들은 이러한 처리 방법이 다른 바이러스의 구조 단백질을 검출하는데 응용될 수 있는지를 연구하였다.

HBV 코어 항원에 대한 모노클로날 항체(Tokushu Menneki Kenkyuusho [Special Immunology Research Institute])를 0.1M 탄산염 완충액(pH 9.6)에 3μg/ml의 농도로 희석하고 100μl의 분획액에 분산시켰다. 평판을 밤새 4°C에서 배양한 후 인산염 완충액으로 세척하고 1% BSA 용액의 350μl 분획액을 평판에 현탁시켰다. 실온에서 2시간 동안 정치시킨 후 1% BSA 용액을 빨아내고 200μl의 반응 용액을 첨가하였다.

제조한 HBV 코어 항원을 표준물로서 사용하고 HBe 항원에 대해 양성으로 판정되고 항-HBe 항체에 대해 음성으로 판정된 5명의 환자 혈청과 10명의 정상인 혈청을 샘플로서 사용하였다. 100μl의 샘플에 50μl의 처리시약(7.5% SDS, 0.75% CHAPS, 0.15% 트리톤 X100, 2M 요소, 0.1M 히스티딘, 0.1M 트립토판)을 첨가하고 56°C로 30분 동안 처리하였다. 처리후 50μl를 반응용액이 채워진 웰에 첨가하고 실온에서 90분 동안 배양하였다.

대조용으로서(예비처리하지 않음), 100μl의 각 샘플을 50μl의 정제수로 희석하고 50μl의 희석된 샘플을 반응에 사용하였다. 세척액으로 5회 세척한 후 바이오틴-표지 항-HBV 코어 모노클로날 항체(동량의 HBc-2, HBc-5와 HBc-14의 혼합물)를 첨가하고 실온에서 30분 동안 배양하였다. 세척액으로 5회 세척한 후 아비딘-표지 알카리성 포스포타제를 첨가하고 혼합물을 실온에서 30분 동안 반응시켰다.

세척액으로 5회 세척한 후 CDPstar(감작제로서의 에메랄드 II)를 첨가하고 실온에서 15분 동안 반응시킨다. 이를 미의 상대적, 화학발광을 측정하였다. 면속적으로 희석된 제조한 HBV 코어 항원에 대한 표준 곡선이 도 17에 나타나 있고 측정된 샘플내 코어 항원의 양은 표 9에 나타나 있다. 검출 한계는 21ng/ml이었다. 코어 항원 양성을 코어 항원 품질과 구별짓는 컷오프 값을 60ng/ml로 정의하였을 때 10명의 모든 정상인 혈청은 예비처리를 하든 하지않던 코어 항원에 대해 음성을 판정되었고 B형 간염 바이러스를 보유한 환자의 혈청에서는 예비처리되지 않은 경우 코어 항원은 검출할 수 없었으나 예비처리한 경우의 모든 혈청은 코어 항원에 대해 양성으로 판정되었다.

B형 간염 바이러스를 보유한 혈청에 있어서 예비처리는 바이러스를 분쇄시키고 항-HBc 항체를 불활성화시킴으로써 코어 항원의 검출을 가능하게 한 것으로 여겨진다. 상기로부터, 본 샘플 처리 방법은 HCV외에

개념으로서 DNA를 갖는 HBV와 같은 바이러스의 구조 단백질을 검출하는데 유용한 것으로 확인되었다. 물론 이것은 플라비바이러스와 레트로바이러스(예, HIV)와 같은 HCV-연관된 바이러스에 대해서도 마찬가지로 적용된다.

(표 9)

생물 번호	미처리		예비처리	
	HBV 코어 항원 (ng/ml)	판정	HBV 코어 항원 (ng/ml)	판정
정상인 샘플 1	<21	음성	<21	음성
정상인 샘플 2	<21	음성	<21	음성
정상인 샘플 3	<21	음성	<21	음성
정상인 샘플 4	<21	음성	<21	음성
정상인 샘플 5	<21	음성	46	음성
정상인 샘플 6	<21	음성	<21	음성
정상인 샘플 7	<21	음성	47	음성
정상인 샘플 8	<21	음성	<21	음성
정상인 샘플 9	<21	음성	26	음성
정상인 샘플 10	<21	음성	56	음성
HBV 샘플 11	<21	음성	98	양성
HBV 샘플 15	<21	음성	94	양성
HBV 샘플 20	<21	음성	780	양성
HBV 샘플 21	<21	음성	270	양성
HBV 샘플 46	<21	음성	630	양성

실시예 15. 항원을 예비처리하지 않고서 효과적으로 검출하는 방법

HCV 입자-함유 샘플을 계면활성제-첨가된 반응 용액에 희석하고 HCV 항원의 검출 효율을 연구하였다.

HCV 코어 항원에 대한 모노클로날 항체를 사용한 샌드위치 효소면역검정(EIA)에 의해 HCV 코어 항원의 검출을 실시하였다. 실시예 3에서 얻은 모노클로날 항체 가운데 C11-3 및 C11-7을 코어 항원을 포획하기 위한 항체로서 사용하였고 C11-10 및 C11-14를 포획된 코어 항원을 검출하기 위한 항체로서 사용하였다.

EIA는 다음의 조건을 사용하여 반드시 실시하였다. 아세테이트 완충액중에 $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ 으로 각각 희석된 모노클로날 항체 C11-3 및 C11-7의 용액을 미소역가 평판에 첨가하고 4°C 에서 밤새 배양하였다. 인산염 완충액으로 세척한 후 1% BSA가 함유된 인산염 완충액을 기하여 차단시켰다. 평판에 100%의 반응용액과 100㎕의 샘플을 첨가하였다. 이어서, 평판을 교반시키고 실온에서 1.5시간 동안 배양하였다. 저농도의 계면활성제가 첨가된 인산염 완충액으로 세척하여 미반응된 물질을 제거하였다. 그런후 알카리성 포스파타제-표지 모노클로날 항체 C11-10과 C11-14를 첨가하고 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 저농도의 계면활성제가 첨가된 인산염 완충액으로 세척하여 미반응된 물질을 제거하였다. 이어서, 기질 용액(CPstar/에머랄드 II)을 첨가하고 실온에서 20분 동안 반응시켰다. 발광의 양을 측정하였다.

상기 반응액에 여러가지 계면활성제를 첨가하여 이들의 효과를 연구하였다. HCV에 대한 항체의 역가가 검출 한계이하이고 실제로 HCV에 대한 항체가 전혀 활용되어 있지 않은 HCV-양성 혈청을 사용함으로써, 발광의 양을 기준으로한 코어 항원의 활성을 1.0으로서 정의한 절상인 혈청의 발광 양에 대한 상대적인 반응비로서 표시하였다. 이의 결과는 표 10 및 표 11에 나타나 있다.

/ 표 5)

정상인 혈청에 대한 상대적인 반응성(S/N 비)

	45번	46번	3번	7번	19번
무첨가	15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
관절 기준	>30.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
첨가제	HLB (%)				
유아운성 계면활성제					
나트륨 도데실 세레이트	40.0 2.0	5.42 5.73			
나트륨 도데실-N-사르고시네이트	0.5 2.0	12.79 125.43	2.70 7.27	3.83	3.70
페플루오로알킬카르복실산 S-113	0.5 2.0	10.55 6.72	1.27 0.91		6.71
약아운성 계면활성제					
세틸트리에틸암모늄 브로마이드	0.5 2.0	72.97 44.55	7.42 5.35	3.09	3.52
도데실파리디늄 클로라이드	0.5 2.0	53.43 12.44	4.70 2.49	2.05	1.52
n-도데실트리메틸암모늄	0.5 2.0	66.84 27.98	4.43 3.77	2.41	1.63
태트라데실암모늄 브로마이드	0.05	14.69			
n-옥틸트리메틸암모늄 큐로라이드	0.5 2.0	12.57 11.46		1.00	0.74
n-데실트리메틸암모늄 클로라이드	0.5 2.0	17.50 45.21		0.88 1.12	0.72 1.08
암죽성 계면활성제					
CHAPS	0.5 2.0	29.57 25.32		1.63	1.82
페플루오로알킬베타인 S-132 (아사히 글래스토부터 입수)	0.5 2.0	11.07 10.77	1.61 1.49		2.42
3-(도데실디메틸암모니오)-1- 프로판-설파산	0.5 2.0	57.69 113.19		4.57	3.44
					5.26

/FIG. 11/

정상인 혈청에 대한 상대적인 반응성(S/N 비)

		45번	46번	3번	7번	19번
무첨가		15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
관점 기준		>30.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
첨가제	HLB (%)					
비이온성 계면활성제						
MEGA-10		0.5 2.0	32.11 38.49	3.38 3.53	1.97	1.87
트원 20	16.7	0.5 2.0	15.88 12.36			
트원 40	15.6	0.5 2.0	14.96 19.10	1.02 1.32	0.99 1.25	1.41 1.64
트원 80	15.0	0.5 2.0	12.45 17.47	1.33	1.23	1.10
노니데트 P-40	13.1	0.5	43.14	3.09	2.95	4.58
옥틸 글루코사이드		0.5 2.0	12.48 25.07	0.90 1.92	0.60 1.20	0.97 2.63
트리톤 X101	13.4	0.5 2.0	26.50 60.84	1.85 2.23	1.62 2.28	2.70 3.81
트리톤 X100	13.5	0.5 2.0	27.72 71.08			
트리톤 X114	12.4	0.5 2.0	31.49 58.62	2.04 1.92	1.65 2.11	2.77 2.51
트리톤 X305	17.3	0.5 2.0	10.50 25.91	0.94 1.30	0.97 1.24	1.08 1.87
트리톤 X405	17.9	0.5 2.0	12.54 24.92	0.86 1.21	0.78 1.24	1.04 1.25
기타						
엔질리에틸암모늄		0.5	5.45	1.00		
클로라이드		2.0	7.01	1.12		
트리에틸아민		0.5	3.89	0.97		
계면활성제 혼합물						
2% 나트륨 도데실-N-사르코시네이트 + 2% 트리톤 X100		244.13		6.11	5.50	12.71

상기 결과로부터 트리톤 X100으로 예시된 12 내지 14의 HLB를 갖는 음이온성 계면활성제의 첨가는 발광 양의 증가를 일으키며 그럼으로써 정상인 혈청에 비하여 HCV-양성 혈청에서 검출 민감성을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, 유사하게, 나트륨 도데실-N-사르코시네이트와 도데실 트리메틸암모늄으로 예시된 바로서, 탄소수 10 이상 직쇄 일킬기와 이차, 삼차 또는 사차 아민을 갖는 계면활성제의 첨가는 HCV-양성 혈청에서 검출 민감성을 증가시켜 주는 것이 명백하였다. 이와 같은 민감성의 증가는 탄소수가 80이하인 알킬기를 갖는 계면활성제(n-옥틸 트리메틸암모늄 클로라이드)로는 관찰되지 않았다. 또한, 이를 두 계면활성제를 혼합하고 첨가함으로써(표 11에서 2% 나트륨 도데실-N-사르코시네이트와 2% 트리톤 X100이 혼합되었다), HCV-양성 혈청에서의 검출 민감성은 좀더 증가시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.

실시예 16. HCV 감염후와 항-HCV 항체의 출현전 사이의 기간(잠복기)동안에 샘플내 코어 항원의 검출
 일차 반응 용액에 2% 트리톤 X100과 2% 나트륨 도데실-N-사르코시네이트를 첨가하여 시판되고 있는 세로컨 버전 패널 PHV905(B.B.I. Inc.)을 실시예 15에 따라 측정하였다. 사용된 PHV905 패널은 항-HCV 항체 시험(오르토 EIA 3.0)으로 측정하였을 때 관찰개시후 21일째 양성으로 전환하였다(혈청 번호 PHV905-7). 이 시험에서, 항체역가는 컷오프 지수(S/CO)로 표시되며 1.0 이상의 값을 양성으로 판명된다. HCV 코어 항원의 활성(발광의 양)을 1.0으로 정의한 정상인 혈청의 활성에 대한 상대적인 반응성(S/N)으로 표시되었다.

도 12에서 보는 바와 같이 코어 항원의 활성은 항-HCV 항체가 출현하기전에 관찰된다. 계면활성제의 첨가는 고정된 모노클로날 항체와 반응한 바이러스 입자로부터 코어 항원을 노출시켰고 그럼으로써 코어 항원의 검출을 확인시켜 주었다.

(표 2)

혈청 번호	판찰 개시후 경과일	HCV 코이 항원 양성 (S/N)	항-HCV 항체 양성 (S/CO)
PHV905-1	0	5.32	0.000
PHV905-2	4	8.30	0.000
PHV905-3	7	15.63	0.000
PHV905-4	11	4.37	0.300
PHV905-5	14	14.75	0.700
PHV905-6	18	7.57	0.700
PHV905-7	21	4.82	2.500
PHV905-8	25	3.31	5.000
PHV905-9	28	1.61	5.000

특허협력조약 규칙 13-20에서 규정한 미생물 참조

기탁기관명: 통상산업성공업기술원생명공학연구소(the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology)

기탁기관주소: 일본국 이바라키현 츠쿠바시 히가시 1-조메 1-3(우편번호 305)

(1) 미생물 표시: HC11-3

기탁일: 1997년 7월 4일

기탁번호: FERM BP-6002

(2) 미생물 표시: HC11-7

기탁일: 1997년 7월 4일

기탁번호: FERM BP-6003

(3) 미생물 표시: HC11-10

기탁일: 1997년 7월 4일

기탁번호: FERM BP-6004

(4) 미생물 표시: HC11-11

기탁일: 1997년 7월 4일

기탁번호: FERM BP-6005

(5) 미생물 표시: HC11-14

기탁일: 1997년 7월 4일

기탁번호: FERM BP-6006

<110> Tonen Corporation

<120> Methods for detecting or assaying virus

<130> 5-1998-081423-1

<150> PCT/JP 97/209515

<151> 1997-08-04

<150> PCT/JP 97/209522

<151> 1997-08-04

<150> PCT/JP 98/218136

<151> 1998-07-31

<160> 8

<170> KOPATIN 1.0

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Ser Leu Asp Arg Asp Pro Glu
 1 5 10 15
 Phe Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr
 20 25 30
 Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val
 35 40 45
 Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg
 50 55 60
 Ala Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg
 65 70 75 80
 Pro Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro
 85 90 95
 Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly
 100 105 110
 Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp
 115 120 125
 Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr
 130 135 140
 Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe
 145 150 155 160
 Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu
 165 170 175
 Asp
 <210> 2
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus
 <400> 2
 Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15
 Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30
 Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45
 Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg Pro
 50 55 60
 Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp
 85 90 95
 Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
 100 105 110
 Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
 115 120 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe Leu
 130 135 140

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145 150 155 160

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic protein
 <400> 3

Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly Val Tyr Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Arg Arg
 20

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic protein
 <400> 4

Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg
 1 5 10

<210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic protein
 <400> 5

Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg
 1 5 10 15

Ser Arg Asn Val Gly
 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic protein
 <400> 6

Asp Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu
 1 5 10 15

Thr Cys Gly Phe.

20

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe, synthetic DNA
 <400> 7

gaattccatgg scacgaatcc taaa

24

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe, synthetic DNA
 <400> 8

ttatgcctcc agaaccggaa c

21

(5) 청구항 5

(1) 음이온성 계면활성제와 (2) 양쪽성 계면활성제, 비이온성 계면활성제 또는 단백질 변성제를 함유한 처리 용액으로 바이러스-함유 샘플을 처리함을 특징으로하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법.

청구항 6

(1) 음이온성 계면활성제, (2) 양쪽성 계면활성제와 (3) 비이온성 계면활성제 또는 단백질 변성제를 함유한 처리 용액으로 바이러스-함유 샘플을 처리함을 특징으로하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법.

청구항 7

(1) 음이온성 계면활성제, (2) 양쪽성 계면활성제와 (3) 비이온성 계면활성제와 (4) 단백질 변성제를 함유한 처리 용액으로 바이러스-함유 샘플을 처리함을 특징으로하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서, 처리 용액이 요소, 이미다졸 환-함유 화합물 또는 인돌 환-함유 화합물을 추가로 함유하는 방법.

청구항 9

제4항에 있어서, 이미다졸 환-함유 화합물이 이미다졸, 히스티딘, 이미다졸마크릴산, 이미다졸카르복시알데하이드, 이미다졸카르복스아미드, 이미다졸디온, 이미다졸디티오카르복실산, 이미다졸디카르복실산, 이미다졸메탄을, 이미다졸리딘티온, 이미다졸리돈, 히스타민 또는 아미다조피리미딘인 방법.

청구항 10

제4항에 있어서, 인돌 환-함유 화합물이 트립토판, 인돌마크릴산, 인톨, 인돌아세트산, 인돌아세트 하이드라자이드, 메틸 인돌아세테이트, 인돌부틸산, 인돌아세토니트릴, 인돌카르비놀, 인돌카르복시알데하이드, 인돌카르복실산, 인돌에탄올, 인돌락트산, 인돌메탄올, 인돌프로피온산, 인돌피루브산, 인돌릴 메틸 케톤, 인돌마이신, 인돌아세톤, 인돌메타신, 인도프로펜 또는 인돌아민인 방법.

청구항 11

(1) 카오트로픽(chaotropic) 미온과 (2) 산성화제를 함유한 처리 용액으로 바이러스-함유 샘플을 처리함을 특징으로하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법.

청구항 12

(1) 카오트로픽 미온, (2) 산성화제와 (3) 비이온성 계면활성제를 함유한 처리 용액으로 바이러스-함유 샘플을 처리함을 특징으로하는 바이러스-함유 샘플의 처리 방법.

청구항 13

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가, 게놈 RNA 또는 DNA를 캡슐화하는 구조 단백질 및 이를 에워싸는 막 단백질 또는 지질 막을 포함하는 구조를 갖는 바이러스 입자를 형성하는 바이러스인 방

법.**청구항 10**

제9항에 있어서, 바이러스가 C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, G형 간염 바이러스, 수족구 질환 바이러스, 플라비바이러스(황열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 뎅그열 바이러스), 토가바이러스(알파바이러스, 루비바이러스, 마데리바이러스, 블루바이러스), 페스티바이러스(돼지 클레라 바이러스, 소 이질 바이러스), 파라마이소바이러스(파라인플루엔자 바이러스 1, 2, 3, 4, 개 질병 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, RS 바이러스, 우역 바이러스, 원숭이 파라인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스), 오르토마이소바이러스(사람 인플루엔자 바이러스, 조류 인플루엔자 바이러스, 말 인플루엔자 바이러스, 돼지 인플루엔자 바이러스), 란보도바이러스(광견병 바이러스, 소수포성 구내염 바이러스), 피코나바이러스(플리오바이러스, 콕시키바이러스, 에코바이러스, 소엔테로바이러스, 돼지 엔테로바이러스, 원숭이 엔테로바이러스, 마우스 뇌염 바이러스, 사람 리노바이러스, 소 리노바이러스, 말 리노바이러스, 족구 질병 바이러스, A형 간염 바이러스), 코로나바이러스(사람 코로나바이러스, 조류 감염성 기관지염 바이러스, 마우스 간염 바이러스, 돼지 전파성 위장염 바이러스), 아레나바이러스(임파구성 맥락수막염, 라사 바이러스, 한국 유행성 쑥혈병 바이러스), 레트로바이러스(HTLV: 사람 성인 백혈병 바이러스, HIV: AIDS 바이러스, 고양이 백혈병 육종 바이러스, 소 백혈병 바이러스, 루스 육종 바이러스), 레오바이러스(로타바이러스), 칼시바이러스(노르월크 바이러스), 벤야바이러스(신장 증후군 유행성 출혈열 바이러스), 필로바이러스(에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스), B형 간염 바이러스(HBV), 천연두 바이러스(백시니아 바이러스, 알라스트림 바이러스, 우두 바이러스, 두창 바이러스), 파라보바이러스(사람 파라보바이러스, 돼지 파라보바이러스, 소 파라보바이러스, 개 파라보바이러스, 고양이 백혈구감소증 파라보바이러스, 알루시안 링크 질병 바이러스), 파보바바이러스(유두종 바이러스, 플리오마 바이러스), 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스(헤르페스 심플렉스 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 수두 헤르페스 조스터 바이러스, EB 바이러스, 말 헤르페스 바이러스, 고양이 헤르페스 바이러스, 마렉 질병 바이러스) 또는 아프리카 돼지 클레라 바이러스인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 C형 간염 바이러스(HCV) 또는 D형 간염 바이러스(HDV)인 방법.

청구항 12

바이러스 항원의 존재를 검출 또는 정량하기 위하여 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 샘플 처리 방법을 사용하고 바이러스 항원을 특이적으로 인식하는 팀첨과 샘플을 반응시킴을 특징으로 하는 바이러스 쟁정 방법.

청구항 13

HC11-11(FERM BP-6005), HC11-14(FERM BP-6006), HC11-10(FERM BP-6004), HC11-3(FERM BP-6002) 및 HC11-7(FERM BP-6003)으로 이루어진 그룹중에서 선택된 하이브리도마 세포주.

청구항 14

HC11-11(FERM BP-6005), HC11-14(FERM BP-6006), HC11-10(FERM BP-6004), HC11-3(FERM BP-6002) 및 HC11-7(FERM BP-6003)으로 이루어진 그룹중에서 선택된 하이브리도마에 의해 생성된 모노클로날 항체.

청구항 15

제12항의 면역검정 방법에 사용하고 음이온성 계면활성제를 포함하여 샘플내 바이러스의 유무를 측정하기 위한 키트, 검정키트 또는 진단제.

청구항 16

제12항의 면역검정 방법에 사용하고 제14항의 모노클로날 항체를 포함하여 샘플내 바이러스의 유무를 측정하기 위한 키트, 검정키트 또는 진단제.

청구항 17

제12항의 면역검정 방법에 사용하고 카오트로픽제를 포함하여 샘플내 바이러스의 유무를 측정하기 위한 키트, 검정키트 또는 진단제.

청구항 18

제12항의 면역검정 방법에 사용하고 하이브리도마 HC11-14(FERM BP-6006), HC11-10(FERM BP-6004) 또는 HC11-11(FERM BP-6005)에 의해 생성된 모노클로날 항체를 포함하여 샘플내 바이러스의 유무를 측정하기 위한 키트, 검정키트 또는 진단제.

청구항 19

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 요소, 이미다졸 환-합유 화합물 또는 인돌 환-합유 화합물을 추가로 함유하는 진단 키트.

청구항 20

제19항에 있어서, 이미다졸 환-합유 화합물이 이미다졸, 히스티딘, 이미다졸아크릴산, 이미다졸카르복시알데하이드, 이미다졸카르복스아미드, 이미다졸디온, 이미다졸디티오카르복실산, 이미다졸디카르복실산, 이미다졸메탄올, 이미다졸리딘티온, 이미다졸리돈, 히스타민 또는 이미다조피리미딘인 진단 키트.

청구항 21

제19항에 있어서, 인돌 환-할유 화합물이 트립토판, 인돌마크릴산, 인돌, 인돌마세트산, 인돌마세트 하이드라이자이드, 메틸 인돌아세테이트, 인돌부틸산, 인돌아세토니트릴, 인돌카르비놀, 인돌카르복시알데하이드, 인돌카르복실산, 인돌메탄올, 인돌락트산, 인돌메탄올, 인돌프로피온산, 인돌피루브산, 인돌릴 메틸 케톤, 인돌마이신, 인돌아세톤, 인돌메타신, 인도프로펜 또는 인돌아민인 진단 키트.

청구항 22

탄소수 10 이상의 알킬기와 미차, 삼차 또는 사차 아민을 갖는 계면활성제 또는 친수/친유기 평형(HLB)이 12 내지 14인 비미온성 계면활성제의 존재하에서 팀첨과의 결합을 기준으로 바이러스 항원을 측정함을 특징으로 하는 바이러스 검정 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 탄소수 10 이상의 알킬기와 미차, 삼차 또는 사차 아민을 갖는 계면활성제가 탄소수 10 내지 20의 알킬기와 삼차 또는 사차 아민을 갖는 계면활성제인 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 삼차 또는 사차 아민 계면활성제가 도데실-N-사르코신산, 세틸 또는 도데실 트리메틸암모늄 염, 3-(도데실디메틸암모니오)-1-프로판설폰산, 도데실피리디늄 염 또는 데카노일-N-메틸 글루카미드(MEGA-10)인 방법.

청구항 25

제22항 또는 제24항에 있어서, 음이온성 계면활성제가 폴리옥시에틸렌 이소옥틸 페닐 에테르 또는 폴리옥시에틸렌 노닐 페닐 에테르인 방법.

청구항 26

제22항 내지 제25항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 항원 팀첨이 바이러스 항원을 위한 항체인 방법.

청구항 27

제22항 내지 제26항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가, 게놈 RNA 또는 DNA를 캡슐화하는 구조 단백질 및 O1을 에워싸는 막 단백질 또는 지질 막을 포함하는 구조를 갖는 바이러스 입자를 형성하는 바이러스인 방법.

청구항 28

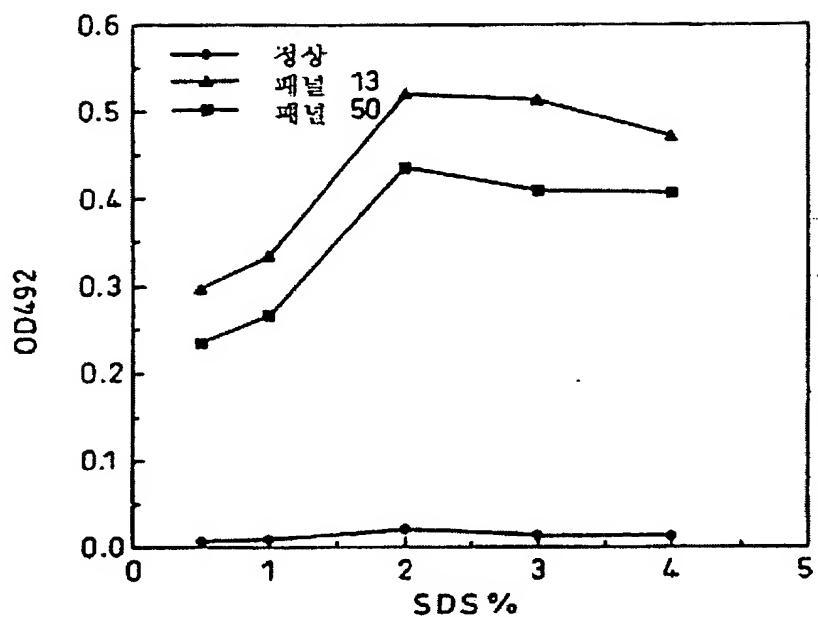
제27항에 있어서, 바이러스가 C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, F형 간염 바이러스, 수족구 질환 바이러스, 플라비바이러스(황열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 일본뇌염 바이러스, 덩그글 바이러스), 토가바이러스(알파바이러스, 루비바이러스, 아테리바이러스, 루벨라바이러스), 페스티바이러스(돼지 클레라 바이러스, 소 아질 바이러스), 파라마악소바이러스(파라인플루엔자 바이러스 1, 2, 3, 4, 개 질병 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, RS 바이러스, 유행 바이러스, 원숭이 파라인플루엔자 바이러스, 흥역 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스), 오르토마이소바이러스(사람 인플루엔자 바이러스, 조류 인플루엔자 바이러스, 말 인플루엔자 바이러스, 돼지 인플루엔자 바이러스), 라브도바이러스(광견병 바이러스, 소수포성구내염 바이러스), 피코나바이러스(폴리오바이러스, 콕사키바이러스, 에코바이러스, 소 엔테로바이러스, 돼지 엔테로바이러스, 원숭이 엔테로바이러스, 마우스 뇌염 바이러스, 사람 리노바이러스, 소 리노바이러스, 말 리노바이러스, 즉구 질병 바이러스, A형 간염 바이러스), 코로나바이러스(사람 코로나바이러스, 조류 감염성 기관지염 바이러스, 마우스 간염 바이러스, 돼지 전파성 위장염 바이러스), 아레나바이러스(임파구성 맥탁수막염, 라사 바이러스, 한국 유행성출혈열 바이러스), 레트로바이러스(HTLV: 사람 성인 백혈병 바이러스, HIV: AIDS 바이러스, 고양이 백혈병 육증 바이러스, 소 백혈병 바이러스, 루스 육증 바이러스), 레오바이러스(로타바이러스), 칼시바이러스(노르윌크 바이러스), 빙마바이러스(신장 증후군 유행성 출혈열 바이러스), 필로바이러스(에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스), B형 간염 바이러스(HBV), 천연두 바이러스(백시니아 바이러스, 일리스트림 바이러스, 우두 바이러스, 두창 바이러스), 파라보바이러스(사람 파라보바이러스, 돼지 파라보바이러스, 소 파라보바이러스, 개 파라보바이러스, 고양이 백혈구감소증 파라보바이러스, 알루시안 링크 질병 바이러스), 파보바바이러스(유두증 바이러스, 폴리오마 바이러스), 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스(헤르페스 심플렉스 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 수두 헤르페스 조스터 바이러스, EB 바이러스, 말 헤르페스 바이러스, 고양이 헤르페스 바이러스, 마릭 질병 바이러스) 또는 아프리카 돼지 클레라 바이러스인 방법.

청구항 29

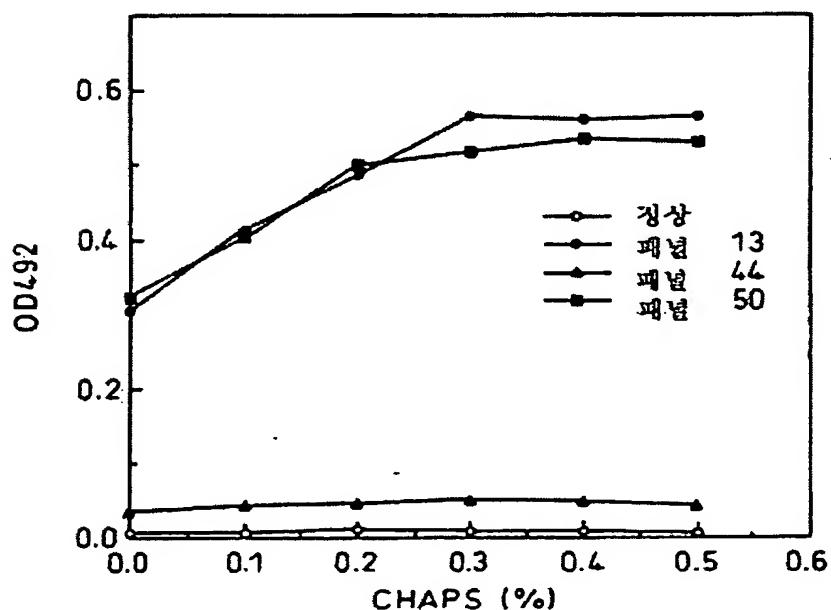
제22항 내지 제28항중 어느 한 항에 있어서, 바이러스가 C형 간염 바이러스(HCV) 또는 B형 간염 바이러스(HBV)인 방법.

도면

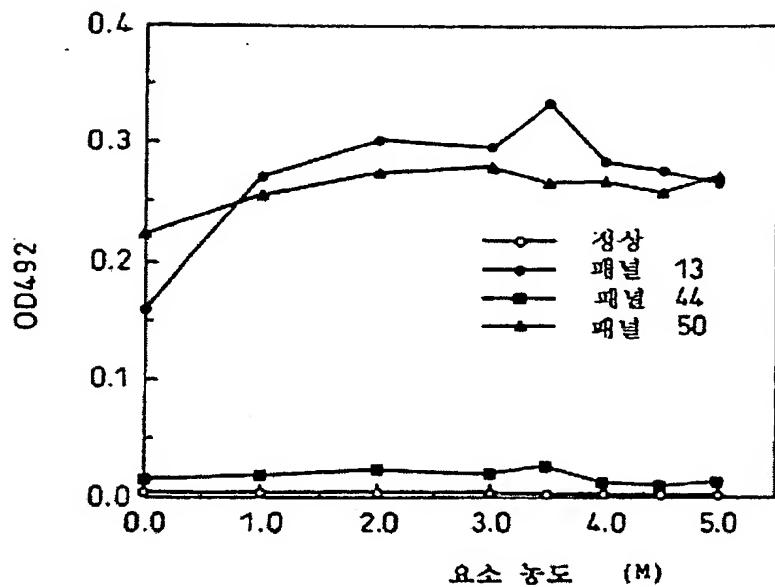
도면1



도면2



도면3



도면4

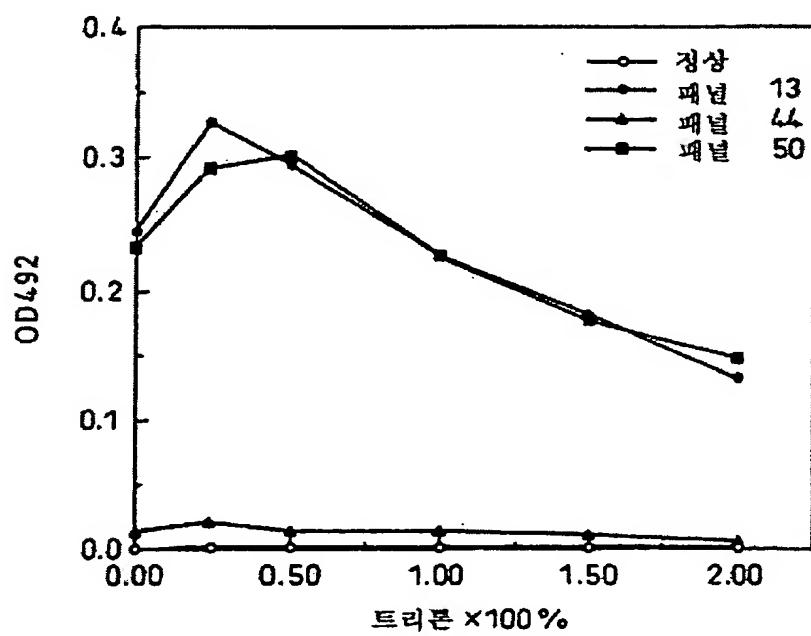


도표5

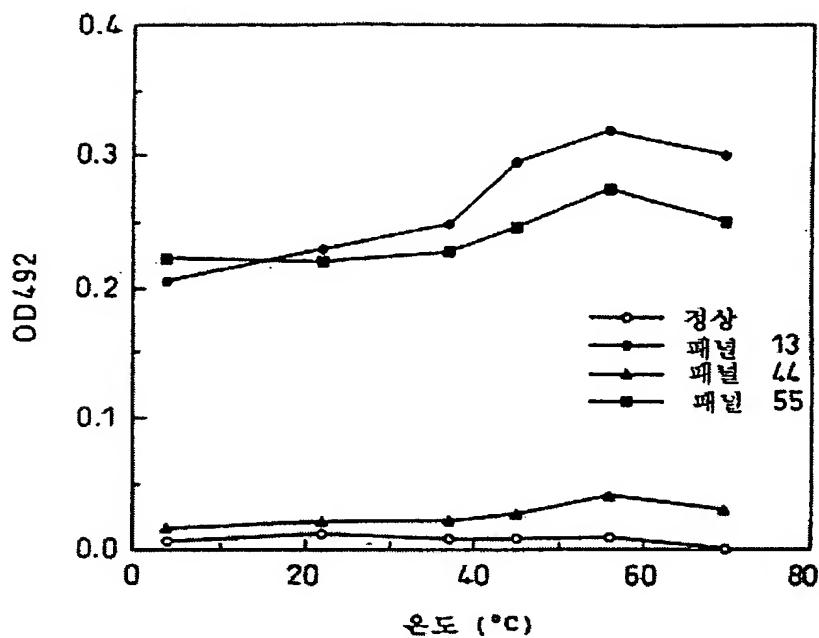
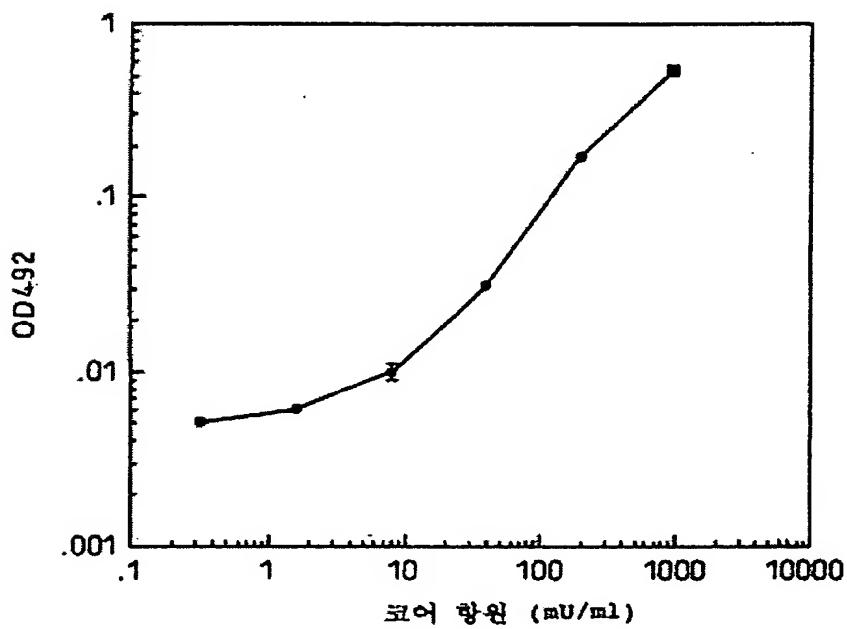
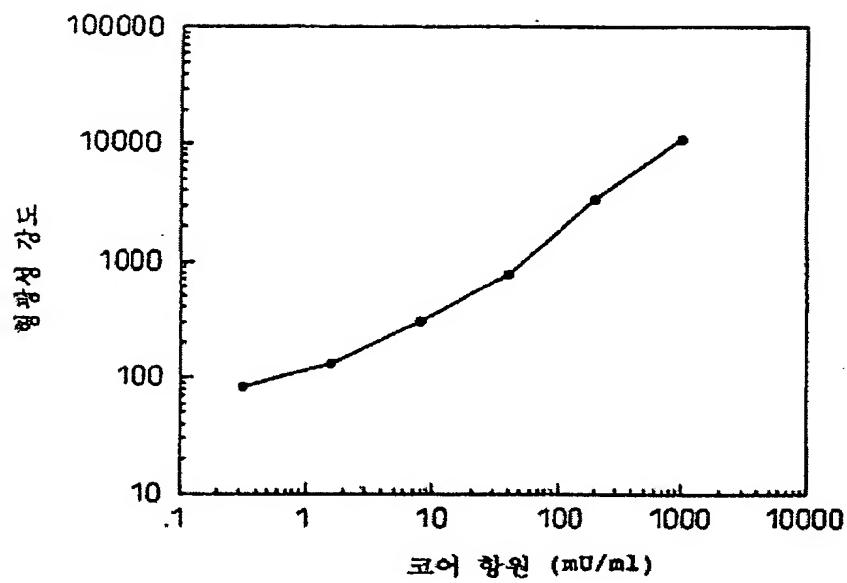


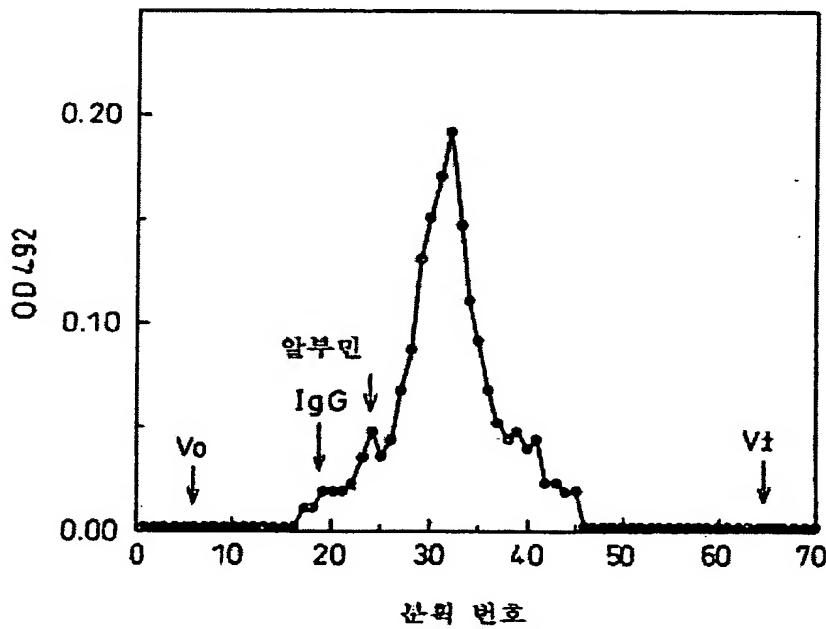
도표6



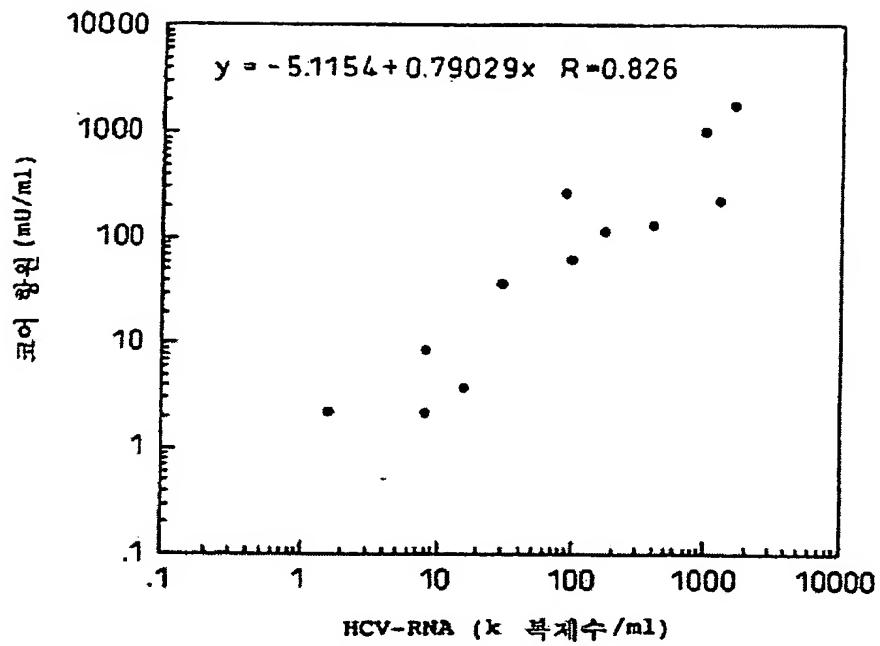
도면7



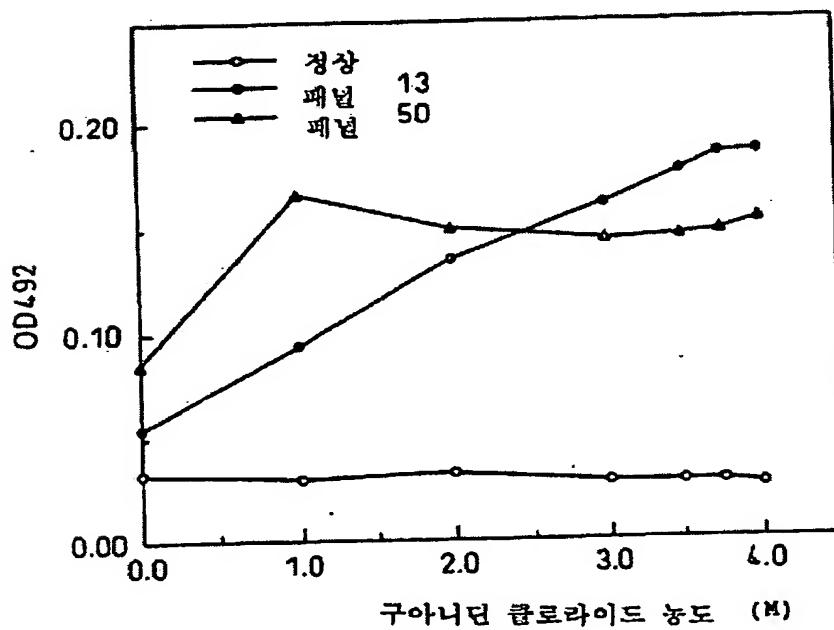
도면8



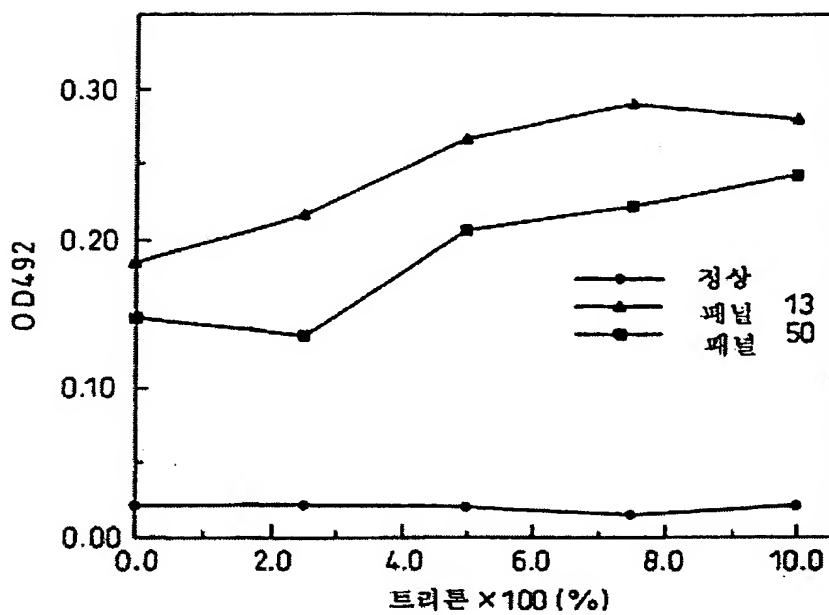
도면9



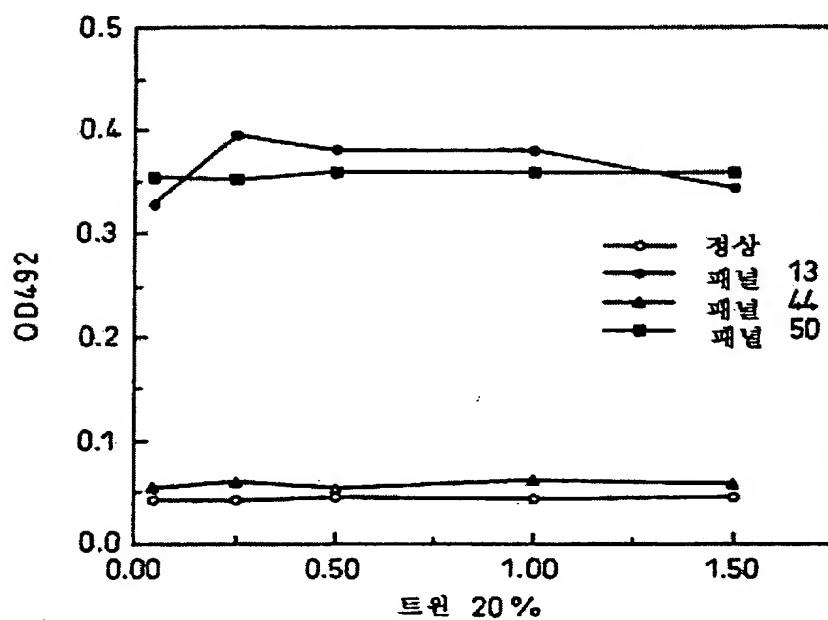
도면10



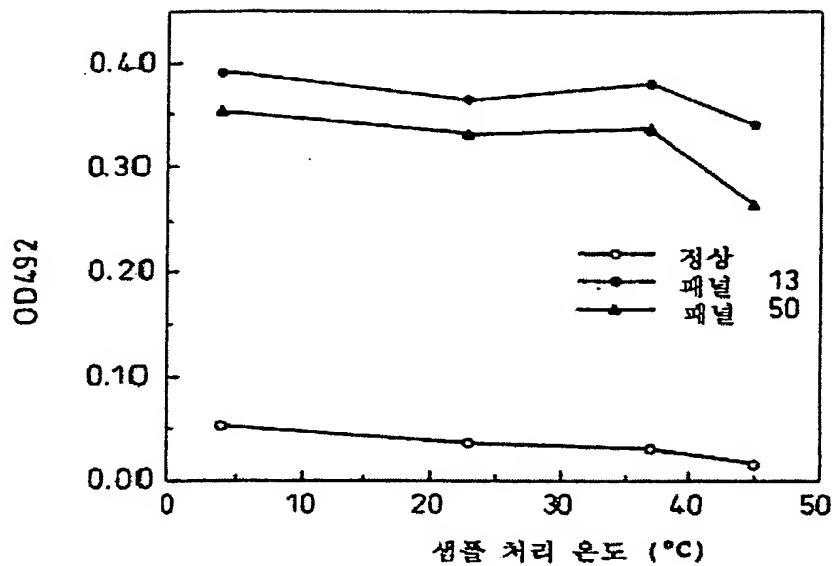
도면 11



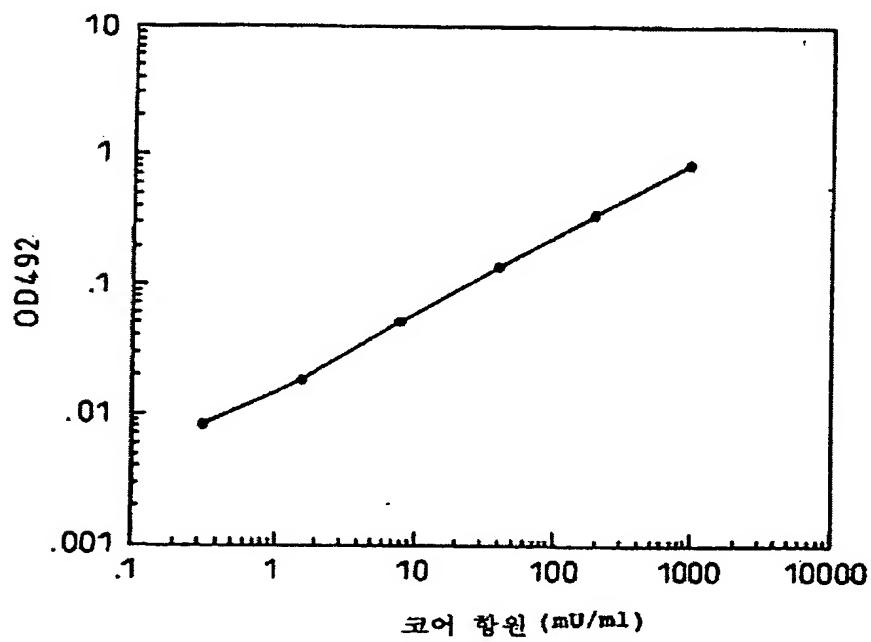
도면 12



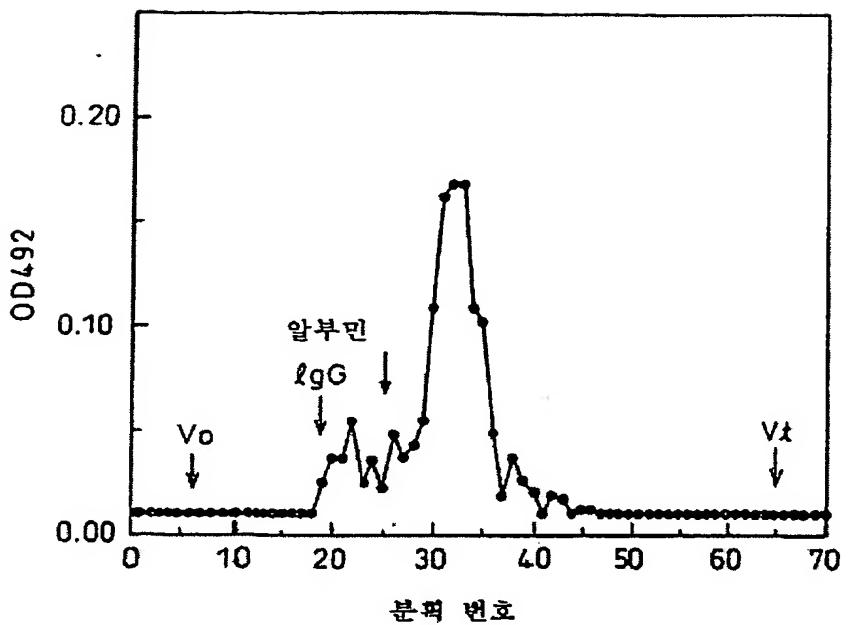
도면13



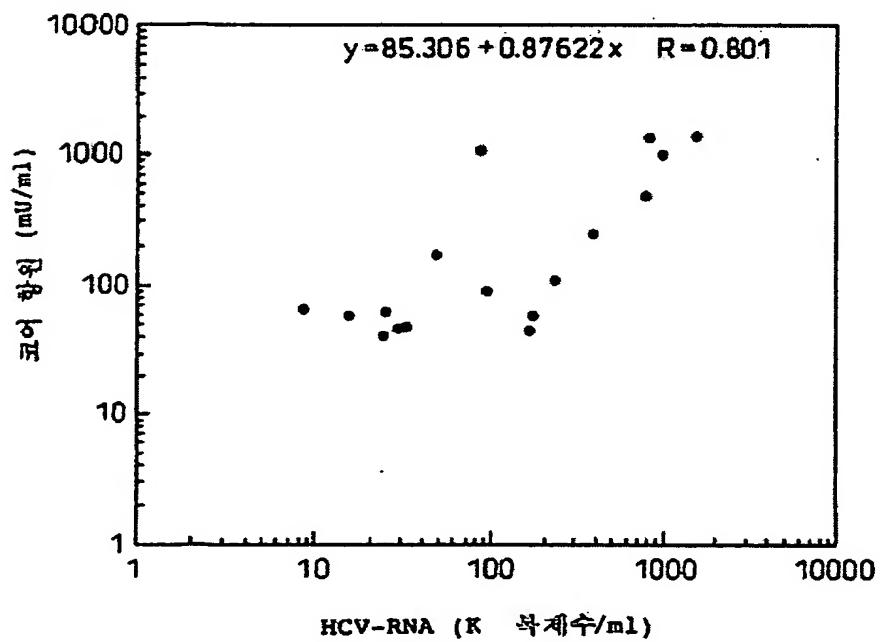
도면14



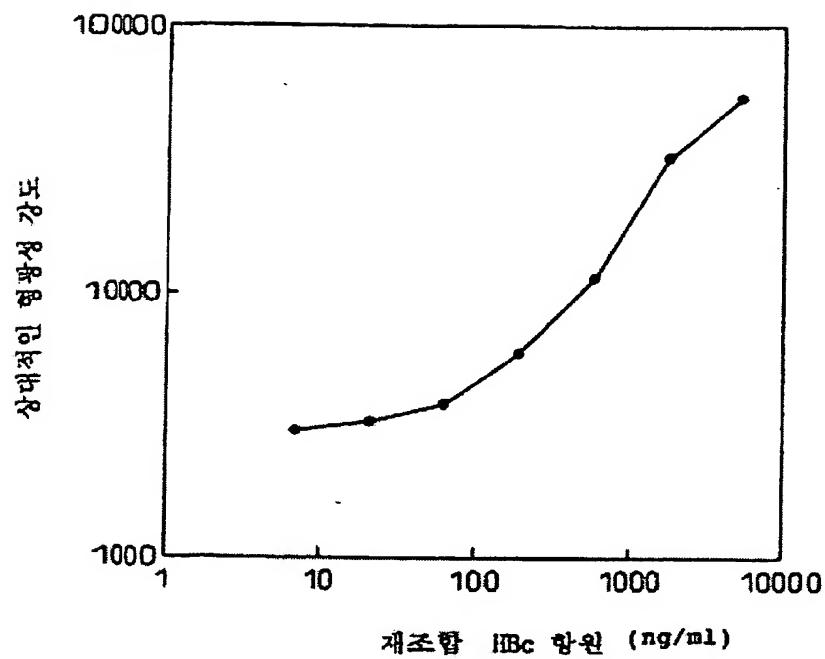
도면 15



도면 16



도면 17





(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 0 967 484 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION
published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:
29.12.1999 Bulletin 1999/52

(51) Int. Cl.⁶: G01N 33/569, G01N 33/576

(21) Application number: 98935359.4

(86) International application number:
PCT/JP98/03476

(22) Date of filing: 04.08.1998

(87) International publication number:
WO 99/06836 (11.02.1999 Gazette 1999/06)

(84) Designated Contracting States:
BE DE ES FI FR GB IT NL SE

• OHUE, Chiharu,
Tonen Corporation
Iruma-gun, Saitama 356-8508 (JP)

(30) Priority: 04.08.1997 JP 20951597
04.08.1997 JP 20952297
31.07.1998 JP 21813698

• IIDA, Kumiko,
Tonen Corporation
Iruma-gun, Saitama 356-8508 (JP)

(71) Applicant:
Advanced Life Science Institute, Inc.
Iruma-gun, Saitama (JP)

• KIMURA, Tatsuji,
Tonen Corporation
Iruma-gun, Saitama 356-8508 (JP)

(72) Inventors:
• AOYAGI, Katsumi,
Tonen Corporation
Truma-gun, Saitam 356-8508 (JP)

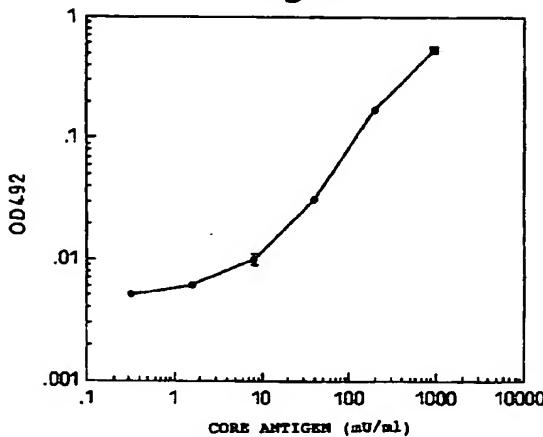
• YAGI, Shintaro,
Tonen Corporation
Iruma-gun, Saitama 356-8508 (JP)

(74) Representative:
Klunker . Schmitt-Nilsson . Hirsch
Winzererstrasse 106
80797 München (DE)

(54) METHODS FOR DETECTING OR ASSAYING VIRUS

(57) A method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) an anionic surfactant and (2) an amphoteric surfactant, non-ionic surfactant or protein denaturant; a virus assay method using said treating method; a method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) a chaotropic ion and (2) an acidifying agent; a virus assay method using said treating method; a virus assay method, characterized in that a virus antigen and a virus antibody are measured based on their binding to their probe in the presence of a surfactant with an alkyl group of 10 or more carbon atoms and a secondary, tertiary or quaternary amine, or a non-ionic surfactant, or of both of them; and a monoclonal antibody and a hybridoma producing the same for carrying out said method.

Fig. 6



Description**Technical Field**

5 [0001] The present invention relates to methods of detecting or measuring viruses and reagents therefor.

Background Art

[0002] Currently, various methods of detecting viruses have been used to detect the presence of infectious viruses in blood or blood products, and to identify the presence of viruses in patients with diseases. However, these methods are not always highly sensitive or specific though the sensitivity and the specificity may vary with the type of virus to be detected. Even when they are sensitive and specific enough, they are often expensive and require lengthy procedures as in the culture and isolation of a virus. As a background to the present invention, type C hepatitis (hepatitis C) will be mentioned in detail below.

10 [0003] The causative agent of hepatitis C had long been unknown, but when the gene of the virus was cloned (Science 244: 359-362, 1989) and a diagnostic method by antibody measurement using a recombinant antigen generated based on said gene was developed (Science 244: 362-364, 1989; Japanese Patent Publication (Kohyo) 2 (1990)-500880), it was found that hepatitis C is an infectious disease whose causative agent is hepatitis C virus (HCV) that is transmitted through the blood and blood products as its main route of infection. With the development of the so-called 15 second generation antibody testing method in which a recombinant core antigen and a recombinant NS3 antigen have been added, it is now possible to identify virtually all HCV patients by testing their serum. This has made it possible to eradicate almost all HCV infections transmitted through blood donations in Japan.

20 [0004] However, as for other common viral infections such as by the human immunodeficiency virus (HIV), there is a period of time until the appearance of antibodies after infection, or the so-called window period in which a virus is unidentifiable by existing testing methods. This means that the risk of secondary infection is still present, due to blood-borne components that cannot be identified by antibody testing methods, in areas where blood-selling is legal or in some regions of Japan. The antibody testing method also has a drawback in that it cannot distinguish a person who has recuperated from an infection and a person who is in the active stage of infection because of its principle of testing.

25 [0005] Interferon (IFN) is currently used for the treatment of hepatitis C. Some researchers insist, however, that the efficacy of the therapy can be evaluated by only measuring the antibody titer of HCV because the titer declines 6 months after elimination of HCV by IFN. However, since the antibody titer starts to decline only after the reduction of antigen stimulation or several months after the elimination of antigen, it is impossible to determine whether IFN administration resulted in the elimination of HCV, at a desired timing and accuracy, by the antibody testing alone. Hence, in order to monitor the therapy, it is necessary to detect HCV per se in addition to the HCV antibody.

30 [0006] It was difficult to establish a method of directly detecting the virus particle (virus antigen) of HCV because blood levels of the virus are very low as compared to other viruses such as hepatitis B virus (HBV) and because the virus cannot be propagated in vitro or using an animal etc. as a host. Therefore, instead of detecting the virus antigen, methods of detecting the genomic RNA of the virus were developed such as the polymerase chain reaction (PCR) method (Science 230: 1350-1354, 1985) and the branched-chain DNA probe method. But, the method of detecting viral genomes 35 have several problems when compared to the method of detecting virus antigens.

40 [0007] First, it has been pointed out that since the substance to be detected is RNA that is not very stable during storage, the procedure of freezing and thawing of serum may cause a reduction in the measured value. Thus, the serum samples to be tested must be stored more carefully than when they are used in other assay methods. Utmost care must also be taken in transportation of the samples.

45 [0008] Although the testing methods that involve the use of a PCR method are the most sensitive for detecting gene fragments, they have problems in that : reverse transcription from a genomic RNA to a template DNA is often accompanied by losses, which therefor requires great skills to obtain an accurate quantitative value, and : since amplification is an important principle in the methods, a high incidence of false-positives may occur in case of contamination, and thus the processing of a large volume of samples at one time is impossible. Furthermore, even those methods which 50 are postulated to be a simple procedure take 2 hours or more for pretreatment of samples and are complicated since repeated procedures of centrifugation and the like are required. In addition, such complicated procedures lead to increased chances of contamination and thereby increased chances of obtaining false-positive results. On the other hand, the branched-DNA probe method is low in detection sensitivity and besides takes about 20 hours before obtaining test results (Igaku to Yakugaku [Medicine and Pharmacology] 31: 961-970, 1994), and hence the method leaves 55 much to be desired in terms of sensitivity and processing time.

[0009] In order to solve the above-mentioned problems associated with the methods of detecting viral genomes, methods were developed that involve the direct detection of a virus antigen. As shown in Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 8 (1996)-29427, a method was developed that detects the core antigen of HCV in the serum

using monoclonal antibody specific for the core antigen. As has been reported in Tanaka et al., *Journal of Hepatology* 23: 742-745, 1995, and Fujino et al., *Igaku to Yakugaku [Medicine and Pharmacology]* 36: 1065-1070, 1996, methods of detecting the core antigen in the serum have been shown to have a clinical usefulness as do the above-mentioned methods of detecting the viral genome. However, there are still several major problems that need be solved as in the methods of detecting the viral genome.

[0010] One such problem is that the sensitivity, compared to the PCR method, is so low that it cannot be used as a final test method of serum screening. Tanaka et al., *Journal of Hepatology* 23: 742-745, 1995, indicated that the detection limit is 10^4 - 10^5 copies/ml of HCV RNA. Fujino et al., *Igaku to Yakugaku [Medicine and Pharmacology]* 36: 1065-1070, 1996, reported that the method has shown a positive rate of 67% on 102 sera of the patients before treatment with chronic hepatitis C who were found to be RNA positive by the most sensitive detection method of CRT (competitive reverse transcription)-PCR method. That is, in terms of sensitivity, the method lags far behind the most sensitive CRT-PCR method.

[0011] Furthermore, the complicated procedure of treating samples for measurement, and the long time it takes, pose problems when it is used in screening. Thus, the method requires a multi-step procedure for sample (serum) treatment comprising: a polyethylene glycol treatment (4°C , 1 hr) for the concentration of virus particles and the removal of serum components; centrifugation (15 min); the removal of supernatants; urea treatment; the alkali treatment (37°C , 30 min); the addition of the neutralizing agent and the like. In addition, the process of dispersing, with urea, the precipitate having an increased viscosity due to the PEG treatment requires great skill. In order to obtain a reproducible result, therefore, great skill is required and, besides, a minimum of 2 hours of treatment is necessary. Furthermore, such processes as centrifugation, supernatant removal, etc. are not amenable to automation and render the simultaneous treatment of a large number of samples very difficult. Thus, from a viewpoint of ease of handling as well, the method is not suited for applications that require the treatment of a large volume of samples as in screening tests.

[0012] On the other hand, the virus antigen detection system is superior to the highly sensitive PCR method in the following points. Thus, it is very tolerant to contamination because it involves no procedure of excessive amplification in the detection step. Furthermore, since it is intended to detect antigen protein that is relatively stable instead of poorly stable RNA, it requires no excessive care in the storage of samples, it does not require special equipment such as the deep freezer that is needed for samples to be detected by PCR, and the transportation of the samples is also easier.

[0013] These features are suitable for applications in which a large number of samples is measured as in the blood industry or health checkup testing. However, because the disclosed method of detecting the core antigen, as indicated above, is not amenable to automation and is low in sensitivity so that it cannot be a gold standard in applications that require high sensitivity such as in the blood industry, it cannot be applied to tests that handle a large number of samples such as screening, and cannot make the best use of its advantageous features over the PCR method. Furthermore, clinically useful assay methods must always face the challenges of sensitivity, specificity, reproducibility, ease of handling, and low cost, and sustained efforts are needed to satisfy these challenges as much as possible. With regard to detection of virus antigens other than HCV, especially for use in screening handling a large number of samples, there are many methods that are not put into practical use because they are low in sensitivity, as compared to the PCR method, or the desired antigen could not be fully exposed.

Disclosure of the Invention

[0014] It is an object of the present invention to provide a method for detecting various virus antigens, including a method for detecting HCV antigen, that is suitable for treating a large number of samples as in screening in the blood industry and health checkups. In other words, the object of the present invention is to provide the detection system for various virus antigens including a method of detecting HCV antigen that has a sensitivity and specificity equivalent to those of the PCR method, that permit simple pretreatment, or that can be easily automated without pretreatment. Preferred embodiments of the present invention will now be explained hereinbelow with a main reference to HCV.

[0015] According to the first embodiment (1) of the present invention, there is provided a means to detect or determine HCV by disrupting the virus particle, fully exposing the virus antigen, disrupting antibodies, if present, against the virus antigen, and detecting or determining the virus antigen.

[0016] Thus, the present invention provides (I) a method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) an anionic surfactant and (2) an amphoteric surfactant, nonionic surfactant, or protein denaturant.

[0017] The present invention also provides (II) a method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) an anionic surfactant, (2) an amphoteric surfactant and (3) a nonionic surfactant or protein denaturant.

[0018] The present invention also provides (III) a method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) an anionic surfactant, (2) an amphoteric surfactant, (3) a nonionic surfactant and (4) a protein denaturant.

[0019] The present invention also provides (IV) a virus assay method characterized by using a sample treating method according to any one of (I) to (III) and reacting a sample with a probe which specifically recognizes a virus antigen, for detection or quantitation of the presence of the virus antigen.

5 [0020] The present invention also provides a kit, assay kit or diagnostic reagent for determining the presence or absence of a virus in a sample, which is for use in the above (IV) immunoassay method and comprises an anionic surfactant.

[0021] The present invention also provides a kit, assay kit or diagnostic reagent for determining the presence or absence of a virus in a sample, which is for use in the above (IV) immunoassay method and comprises a monoclonal antibody described hereinbelow.

10 [0022] According to the first embodiment (2) of the present invention, there is provided a means to detect or determine a virus by disrupting the virus particle, fully exposing the virus antigen, disrupting antibodies, if present, against the virus antigen and detecting or determining the virus antigen.

15 [0023] Thus, the present invention provides (V) a method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) a chaotropic ion and (2) an acidifying agent.

[0024] The present invention further provides (VI) a method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) an chaotropic ion, (2) an acidifying agent and (3) a nonionic surfactant.

20 [0025] The present invention further provides (VII) a virus assay method, characterized by using a sample treating method according to the above (V) and (VI) and reacting a sample with a probe which specifically recognizes a virus antigen, for detection or quantitation of the presence of the virus antigen.

[0026] The present invention further provides a kit, assay kit or diagnostic reagent for determining the presence or absence of a virus in a sample, which is for use in the above (VII) method and comprises a chaotropic agent. The present invention further provides a kit, assay kit or diagnostic reagent for determining the presence or absence of HCV in a sample, which is for use in the above (VII) method and comprises a monoclonal antibody produced by a hybridoma HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004) or HC11-11 (FERM-BP-6005).

25 [0027] According to the second embodiment of the present invention, there is provided a method to detect or determine a virus antigen during the window period in which antibodies against said virus have not yet been generated. In this method, the disruption of the virus particle to expose the virus antigen is sufficient and there is no need to disrupt antibodies against the virus antigen in the blood.

30 [0028] Thus, the present invention provides a virus assay method characterized by measurement of a virus antigen based on its binding with a probe in the presence of a surfactant with an alkyl group of 10 or more carbon atoms and a secondary, tertiary or quaternary amine, or a nonionic surfactant with a hydrophilic/lipophilic balance (HLB) of 12-14, or of both of them.

35 [0029] The present invention further provides a hybridoma cell line selected from the group consisting of HC11-11 (FERM-BP-6005), HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004), HC11-3 (FERM-BP-6002), and HC11-7 (FERM-BP-6003).

[0030] The present invention also provides a monoclonal antibody produced by a hybridoma cell line selected from the group consisting of HC11-11 (FERM BP-6005), HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004), HC11-3 (FERM BP-6002), and HC11-7 (FERM BP-6003).

40 [0031] Furthermore, HCV which is an RNA virus, and HBV which is a DNA virus, are viruses which form virus particles having a structure comprising a structural protein encapsulating genomic RNA or DNA and a membrane protein or lipid membrane surrounding it. In either embodiment, by using a treating method of the present invention, there is provided detection or determination of a virus characterized by disrupting a virus particle of not only HCV or HBV but also a virus having similar a structure thereto, by fully exposing the virus antigen, and by detecting or determining said antigen.

Brief Description of Drawings

[0032]

50 Fig. 1 is a graph showing the effect of concentration of added SDS on sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13 and 50 were used.

Fig. 2 is a graph showing the effect of concentration of added CHAMPS on sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13 and 50 were used.

55 Fig. 3 is a graph showing the effect of concentration of added urea on sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13, 44, and 50 were used.

Fig. 4 is a graph showing the effect of temperature of added Triton X100 on sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13, 44, and 50 were used.

Fig. 5 is a graph showing the effect of temperature during sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13, 44, and 50 were used.

5 Fig. 6 is a graph showing the dilution standard curve and the detection limit of a sandwich assay system in which a standard panel serum 50, defined as 1 U/ml, was serially diluted and subjected to a sample treating method, and then was measured using a monoclonal antibody of the present invention.

Fig. 7 is a graph showing the dilution standard curve and the detection limit of a sandwich immunoassay system in which a standard panel serum 50, defined as 1 U/ml, was serially diluted and subjected to a sample treating method, and then was measured.

10 Fig. 8 shows an immunological activity of core antigen in fractions obtained by fractionation with a gel filtration column of the panel serum 13 that was subjected to sample treating method. The molecular weight is about 150 kD and about 68 kD for IgG and albumin, respectively.

15 Fig. 9 is a graph showing a correlation between the activity of core antigen released and the amount of HCV-RNA determined using Amplicore HCV Monitor (PCR method) of a PCR-positive sample which was subjected to a sample treating method of the present invention.

Fig. 10 is a graph showing the effect of concentration of added guanidine chloride on sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13 and 50 were used.

Fig. 11 is a graph showing the effect of concentration of added Triton X100 on sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13 and 50 were used.

20 Fig. 12 is a graph showing the effect of concentration of added Tween 20 on sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13 and 50 were used.

Fig. 13 is a graph showing the effect of temperature during sample treatment. Sera from normal healthy human subjects (normal) and HCV-RNA-positive panel sera 13 and 50 were used.

25 Fig. 14 is a graph showing the dilution standard curve and the detection limit of a sandwich immunoassay system in which a standard panel serum 50, defined as 1 U/ml, was serially diluted and subjected to a sample treating method, and then was measured.

Fig. 15 shows an immunological activity of core antigen in fractions obtained by fractionation with a gel filtration column of the panel serum 13 that was subjected to sample treating method. The molecular weight is about 150 kD and about 68 kD for IgG and albumin, respectively.

30 Fig. 16 is a graph showing a correlation between the activity of core antigen released and the amount of HCV-RNA determined using Amplicore HCV Monitor (PCR method) of a sample which was subjected to a sample treating method of the present invention and which tested positive by Amplicore HCV Monitor (PCR method).

Fig. 17 shows a standard curve obtained by determination of recombinant hepatitis B virus (HBV) core antigen according to the present invention.

35 Best Mode for Carrying out the Invention

[0033] The subject viruses of the present invention are viruses which form virus particles having a structure comprising a structural protein encapsulating genomic RNA or DNA and a membrane protein or lipid membrane surrounding it.

40 [0034] Representative examples of the above viruses having RNA as a genome include hepatitis C virus (HCV) and HCV-related viruses.

[0035] HCV-related viruses include hepatitis D virus, hepatitis E virus, hepatitis G virus, hand-foot-and-mouth disease virus, a flavivirus (yellow fever virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, dengue virus), a togavirus (alphavirus, rubivirus, arterivirus, rubella virus), a pestivirus (hog cholera virus, bovine diarrhea virus), a paramyxovirus (parainfluenza virus 1, 2, 3, 4, canine distemper virus, Newcastle disease virus, RS virus, rinderpest virus, simian parainfluenza virus, measles virus, mumps virus), an orthomyxovirus (human influenza virus, avian influenza virus, equine influenza virus, swine influenza virus), a rhabdovirus (rabies virus, vesicular stomatitis virus), a picornavirus (poliovirus, Coxsackie virus, echovirus, bovine enterovirus, porcine enterovirus, simian enterovirus, mouse encephalitis virus, human rhinovirus, bovine rhinovirus, equine rhinovirus, foot and mouth disease virus, hepatitis A virus), a coronavirus (human coronavirus, avian infectious bronchitis virus, mouse hepatitis virus, porcine transmissible gastroenteritis virus), an arenavirus (lymphocytic choriomeningitis virus, lassa virus, Korean hemorrhagic fever virus), a retrovirus (HTLV: human adult leukemia virus, HIV: AIDS virus, feline leukemia sarcoma virus, bovine leukemia virus, Rous sarcoma virus), a reovirus (rotavirus), a calcivirus (Norwalk virus), a bunyavirus (renal syndrome hemorrhagic fever virus), a phylloivirus (Ebola virus, Marburg virus), and the like.

55 [0036] Representative examples of the above viruses having DNA as a genome include hepatitis B virus (HBV) and HBV-related viruses. HBV-related viruses include a pox virus (vaccinia virus, alastrum virus, cowpox virus, smallpox virus), a parvovirus (human parvovirus, porcine parvovirus, bovine parvovirus, canine parvovirus, feline leucopenia virus, Aleutian mink disease virus), a papovavirus (papilloma virus, polyoma virus), adenovirus, a herpes virus (herpes simplex virus, cytomegalovirus, chickenpox zoster virus, EB virus, equine herpes virus, feline herpes virus,

Marek's disease virus), African swine cholera virus, and the like.

[0037] In addition to the above, there are many pathogenic viruses known and there are many unidentified viruses present. It is clear that if such viruses have a structure described above comprising a structural protein encapsulating genomic RNA or DNA and a membrane protein or lipid membrane surrounding it, they can be released in a form suitable for immunoassay using the sample treating method of the present invention.

[0038] Embodiments for carrying out the present invention will now be explained below referring to HCV. Since blood levels of HCV are 10^2 copies/ml to 10^6 copies/ml which are lower than those of HBV (10^9 copies/ml), a very high sensitivity is required for an assay to detect the virus antigen.

[0039] Generally, in a detection method represented by an immunological method that uses antibody as a probe, possible methods to enhance detection sensitivity include I) an increase in the number of the antigen molecules to be detected, II) an increase in the number of molecules of the probe, for example antibody, that binds to the antigen, III) a reduction in nonspecific reactions that define detection sensitivity caused by the binding of the probe, for example antibody, with a substance other than the antigen, and IV) an increase in the detection limit of a label for use in the detection, and an appropriate combination of these methods would enable an increase in sensitivity.

[0040] As a method to increase the number of antigen molecules, I-1) an increase in the amount of sample is most easily conceived. But, since the maximum amount to be added in a commonly used reaction system (for example, a 96-well immunoplate) cannot exceed about 300 μ l, I-1), a concentration method to increase the number of molecules to be added to the reaction system has been used.

[0041] In order to increase the number of probes, for example antibody molecules, that bind to the antigen, the most readily conceived means includes II-1) an increase in the number of epitopes to be recognized using multiple probes, for example antibodies, and II-2) an increase in the number of antibodies bound per unit time by increasing the affinity (affinity and avidity) of the probe, for example antibody, with the antigen. Incidentally, possible methods to enhance the affinity of, for example, antibody include a method of changing the composition of the buffer in the reaction system, a method of altering the probe, and a method of combining these. II-3) Methods are also conceived in which many antigens are captured by binding a large number of antibodies to the carrier having a wide surface area such as beads, magnetic particles, etc. to expand the reaction area with a limited amount of antigen.

[0042] In the case of infectious diseases, human antibodies having a high affinity of binding to antigen are expected to be present in the sample. Accordingly, it is expected that the epitopes of these antibodies overlap with those of the probes, for example antibodies, to be used in the detection, resulting in a competitive reaction that causes a reduction in the number of antibodies to be used for detection. It is, therefore, anticipated that a reduction in these interfering antibodies in the sample leads to an increase in the number of antibody molecules for use in detection that bind to antigen (II-3).

[0043] It is indeed difficult to generalize the methods of reducing nonspecific reactions, but strategies are conceived that reduce nonspecific reactions III-1) to reduce nonspecific reactions by increasing the affinity (affinity and avidity) of the probe, for example antibody, with the antigen by changing the composition of the buffer solution, III-2) to remove the causative agent of the nonspecific reactions, and the like.

[0044] Possible methods to enhance detection sensitivity include: IV-1) to employ a label (a radioisotope, etc.) having a high detection sensitivity; IV-2) to amplify signals by employing an enzyme or a catalyst as a label; IV-3) to change an enzyme substrate into one having a higher sensitivity; IV-4) to amplify signals from an enzymatic reaction or a chemical reaction by an electrical or a mechanical means; IV-5) to increase the number of labels per antibody; IV-6) to enhance the sensitivity of the instrument used for signal detection, and the like.

[0045] Analysis of the steps of pretreatment in the disclosed method for detecting the HCV core antigen revealed that the method comprises the step of concentrating the antigen by adding polyethylene glycol to the sample which is then centrifuged to recover HCV as a precipitate (I-2) and simultaneously removing part of the serum components (II-2), followed by the step of resuspending the precipitate in a solution containing urea and the alkali agent to inactivate human antibody present therein thereby releasing core antigen from HCV (II-3), and the step of adding a solution containing a nonionic surfactant (Triton X100) and a neutralizing agent to prepare a solution which is to be reacted with the monoclonal antibody.

[0046] As described above, centrifugation and resuspension of the precipitate are procedurally complicated steps and require great skill. Thus, a goal of the present invention is a core antigen detection system that resolves the above problems concerning procedures.

[0047] The identity of HCV per se has not been elucidated yet. But, based on the genomic structure, the structures of related virus particles, and general information on viruses, it is estimated that an HCV particle has a genomic RNA that is packed within the core antigen, which in turn is encapsulated by a coat protein comprising E1 and E2/NS1 antigens that are anchored to a lipid membrane surrounding the above packing.

[0048] It is therefore necessary to remove the coating to thereby permit the binding of a probe, for example an antibody, to be used for detection of said core antigen in order to detect core antigen. Furthermore, it has been reported that the virus particle in the blood takes a complex structure in which the particle is surrounded by LDL (low density lipo-

protein) etc., and since antibodies against the coat protein are also present, it is estimated that the virus particle may be present as an immune complex with an anti-coat protein antibody. Thus, in order to increase the number of antigen molecules to be detected, it is important to efficiently remove from the virus particle the coating and contaminants surrounding the virus particle, and to efficiently release the core antigen molecules.

5 [0049] The same holds true for viruses other than HCV and the structural proteins of viruses must be efficiently released.

[0050] Thus, the present invention relates to a treating method that brings a virus antigen in a sample (serum) to a state suitable for detection using a probe, without concentrating the antigen by a complicated procedure such as centrifugation.

10 [0051] Furthermore, since a human antibody may be present, as described above, at a high titer that competes with a probe, for example antibody, for binding, a procedure to remove said antibody is important to enhance sensitivity.

[0052] Thus, one embodiment of the present invention relates to a treating method that easily releases virus antigens in a sample, concurrently inactivating human antibody that may be present in the sample.

15 [0053] By using the treating method of the present invention, virus antigens in a sample is released from a virus particle or an immune complex in a form suitable for forming an immune complex with a probe such as antibody, and by simultaneously inactivating human antibody present in the sample that interferes with the detection reaction, a highly sensitive detection can be readily attained by an immunoassay using a probe such as antibody. According to the first embodiment (1) of the present

20 [0054] invention, a probe such as antibody for use in detection may be any probe, as long as it binds to the virus antigen in a specific manner, it has a certain high affinity, and it does not induce nonspecific reactions when added to the reaction system. For example, in the detection of a HCV core antigen, as described in Example 4, one of the probes used in the primary reaction preferably contains a probe that can recognize and bind to the C-terminal of the HCV core antigen. The C-terminal of the core antigen as used herein means a sequence from 81 to 160 of the sequence shown in SEQ ID NO: 2 or a part thereof. It can also contain a probe for the N-terminal of the HCV core antigen. The N-terminal of the core antigen as used herein means a sequence from 10 to 70 of the sequence shown in SEQ ID NO: 2 or a part thereof.

25 [0055] According to the second embodiment (2) of the present invention, a probe such as antibody for use in the detection may be any probe, as long as it binds to the virus antigen in a specific manner, it has a certain high affinity, and it does not induce nonspecific reactions when added to the reaction system. For example, in the detection of the 30 HCV core antigen, one of the probes used in the primary reaction preferably contains a probe that can recognize and bind to the N-terminal of the HCV core antigen. The N-terminal of the core antigen as used herein means a sequence from 10 to 70 of the sequence shown in SEQ ID NO: 2 or a part thereof. It can also contain a probe for the C-terminal of the HCV core antigen. The C-terminal of the core antigen as used herein means a sequence from 81 to 160 of the sequence shown in SEQ ID NO: 2 or a part thereof.

35 [0056] In any of the above embodiments, any molecule that has a high specificity and affinity for the core antigen can be used as a probe, including: a monoclonal antibody obtained by immunizing an experimental animal such as a mouse, a rabbit, a chicken, a goat, sheep, a bovine, etc., a monoclonal antibody produced by a hybridoma obtained by the fusion of a myeloma cell with a spleen cell that was isolated from an immunized individual, a monoclonal antibody produced by a spleen cell or leukocyte in the blood immortalized by the EB virus, and an antibody produced by a human 40 or a chimpanzee infected with HCV; a recombinant antibody produced by a cell transformed with a recombinant antibody gene generated by combining a gene fragment of a variable region obtained from the cDNA or chromosomal DNA of immunoglobulin of a mouse, a human, etc., a gene fragment of the variable region constructed by combining a part of the cDNA or chromosomal DNA of immunoglobulin with an artificially constructed sequence, a gene fragment of the variable region constructed using an artificial gene sequence, or a gene fragment of the variable region constructed by 45 a gene recombinant technology using the above as building blocks, with a gene fragment of the immunoglobulin constant region; a phage antibody generated by the fusion of a gene fragment described above of the variable region with a structural protein of, for example a bacteriophage, a recombinant antibody produced by a cell transformed with a recombinant antibody gene generated by combining a gene fragment described above of the variable region with part of another suitable gene fragment, for example myc gene, a probe produced by artificially introducing a variable region 50 into the trypsin gene, a probe obtained by artificially altering a molecule that specifically binds to the protein such as receptor, a probe constructed by the combinatorial chemistry technology, and the like.

55 [0057] The present invention further provides the step of treating a sample with a treatment solution capable of releasing a virus antigen from a virus particle or an immune complex and of simultaneously inactivating even a human antibody present in the sample that interferes with the detection reaction in order to generate a state suitable for forming an immune complex of the above virus antigen and a probe thereof such as an antibody from a sample containing the virus antigen, and an assay method and an assay kit for detection and quantitation of the released core antigen by an immunoassay using a probe such as antibody.

The sample treatment solution and the sample treating method provided by the present invention

[0058] Samples as used herein include biological fluids such as whole blood, plasma, serum, urine, saliva, cerebro-spinal fluid, liver tissue and the like.

5 [0059] According to the present invention, the most important requirement is a method of treating a virus antigen such as the core antigen in a sample so as to generate a state suitable for a binding reaction with the probe such as monoclonal antibody without the complicated processing of a sample. Thus, in order to increase the number of antigen molecules, it is important to efficiently release the virus antigen such as the core antigen contained in a virus particle.

10 [0060] As has already been known for sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), most proteins are denatured by heat treatment in the presence of SDS and thereby molecules other than the covalently-bound ones are converted into monomers. Thus, the addition of a treatment agent comprising an anionic surfactant such as SDS causes disruption of viruses as well as the denaturing of antibodies against the virus antigen such as the core antigen in the sample, enabling the release of the virus antigen such as the core antigen in the sample. This was also confirmed for the HCV core antigen as shown in Example 7, that is, when the core antigen in a HCV-infected sample treated with a treatment agent containing SDS was subjected to a molecular weight analysis using gel filtration, it was detected at a position that is theoretically predicted to be the position of the monomer.

15 [0061] As reported by Kashiwakuma et al., J. Immunological Methods 190: 79-89, 1996, when the core antigen isolated by SDS-PAGE from a sample comprising an extract of a cell expressing recombinant HCV is detected using a Western blot analysis, the immunological activity is detected at a position believed to be that of the monomer. It is readily understood by a person skilled in the art that the addition of a denaturant comprising SDS to a sample causes efficient release of antigens and an increase in the number of antigen molecules.

20 [0062] As is well known, however, anionic surfactants such as SDS have a very strong protein-denaturing effect so that when added to a reaction of immune complex formation with the antibody they also denature the antibody and thereby disrupt the function resulting in the reduction in sensitivity. It is also known that the structure of epitopes are destroyed by the treatment with an anionic surfactant causing a weakened bonding with the antibody and a reduced sensitivity. In order to remove the factors responsible for the reduction in sensitivity, the denaturing effect following SDS treatment need to be weakened by some means or other.

25 [0063] It is known that surfactants comprising anionic surfactants may be removed by such means as dialysis, ultra-filtration, gel filtration, electrophoresis, ion exchange, precipitation, membrane transfer, etc. The fact that, as described above, antigens can be detected by a Western blot method or gel filtration method indicates that an antigen-antibody reaction may be effected using a certain procedure following the SDS treatment. However, these methods require both time and complex procedures, which is not suitable for the purpose of the present invention.

30 [0064] By diluting with an excess amount of the reaction solution, it is indeed possible to reduce the denaturing effect to a negligible level that does not affect the reaction, but the method cannot be applied to the methods such as an immunoassay that involves the use of microliter wells in which the amount of samples to be added is limited. In this regard, it is evident that these methods are not suitable for the purpose of the present invention.

35 [0065] Thus, the inventors of the present inventors have investigated, in the first embodiment of the present invention, whether the addition of a treatment agent comprising an anionic surfactant and some additive could reduce the denaturing effect by the anionic surfactant to a level in which the probe such as antibody is not affected, and, at the same time, enhance the releasing effect of the core antigen by the anionic surfactant.

40 [0066] The inventors of the present invention have found that the addition of a treatment agent containing a surfactant other than an anionic surfactant such as SDS can weaken the denaturing effect of SDS on the immobilized antibody and, as a result, can enhance sensitivity as compared to the addition of a treatment agent containing SDS alone. The inventors have also found that when the agents that weaken the hydrogen ion bonding such as a surfactant other than SDS and urea are added to the treatment agent containing an anionic surfactant such as SDS, similar effects were observed, and that the release of the core antigens from the virus particles and the inactivation of the anti-core antigen antibody in the sample were enhanced with a result that the release of the core antigens was further enhanced. The inventors have also found that the detection of the core antigen with a higher sensitivity was attained by a heat treatment after the addition of a treatment agent containing SDS and other surfactants, and have completed the present invention.

45 [0067] The anionic surfactants other than SDS that can be used for the treatment of samples include sodium cetyl sulfate or other alkyl sulfate esters, alkyl sulfonates such as sodium dodecyl sulfonate, alkyl allyl sulfonates, and the like. The surfactants other than the anionic surfactants that can be added include amphoteric surfactants, for example CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), CHAPSO (3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate), dodecyl-N-betaine, 3-(dodecyldimethylammonio)-1-propanesulfonate; nonionic surfactants, for example polyoxyethylene isoocetylphenyl ethers such as Triton X100, polyoxyethylene nonylphenyl ethers such as NP 40, polyoxyethylene sorbitol esters such as Tween 80, polyoxyethylene dodecyl ethers such as Brij 58, and octyl glucoside, with an amphoteric surfactant such as CHAPS and an nonionic surfactant such as Triton X100.

being preferred. It is also advantageous to add an agent (protein denaturant) that disrupts higher structures of proteins such as urea, thiourea, and the like.

[0068] Concentrations preferably used in the treatment are: 0.5% or greater for SDS; 0.1% or greater for CHAPS; 1M or greater for urea; 0.1% or greater and 0.75% or smaller for Triton X100.

5 [0069] The temperature used for the treatment of samples may be any temperature commonly used in the laboratory, i.e. between 4 °C and 100 °C, but when a nonionic surfactant is added care should be taken as to its cloud point. Preferably a temperature of 37 °C or greater is employed and the treatment at a temperature of 50 - 60 °C that is commonly used for the inactivation of the serum is more effective.

10 Removal of interference by hemoglobin

[0070] When serum etc. is used as a sample for measurement, red blood cells contained in said sample undergo hemolysis during the above pretreatment and hemoglobin is released, and the denatured hemoglobin may interfere with measurement by binding to the virus antigen such as the HCV core. Thus, in the first embodiment of the present invention, it is preferred to remove the interference with measurement by capturing the heme in the hemoglobin. As an additive for this purpose, we have found that the addition of at least one of urea and a compound containing an imidazole ring is preferred.

15 [0071] As the imidazole ring-containing compounds, there may be mentioned imidazole, histidine, imidazoleacrylic acid, imidazolecarboxaldehyde, imidazolecarboxamide, imidazoledione, imidazoleedithiocarboxylic acid, imidazolecarboxylic acid, imidazolemethanol, imidazolidinethione, imidazolidone, histamine, imidazopyridine, and the like.

20 [0072] As the indole ring-containing compounds, there may be mentioned tryptophan, indoleacrylic acid, indole, indoleacetic acid, indoleacetic hydrazide, indoleacetic methyl ester, indolebutyric acid, indoleacetonitrile, indolecarbinol, indolecarboxaldehyde, indolecarboxylic acid, indoleethanol, indolelactic acid, indolemethanol, indolepropionic acid, indolepyruvic acid, indolyl methyl ketone, indolmycin, indoleacetone, indomethacin, indoprofen, indoramine, and the like.

25 [0073] The amount added is preferably 0.5M to 5M for urea, 5mM to 50mM for indoleacrylic acid, and 0.05M to 0.5M for the other additives.

[0074] On the other hand, membrane proteins such as the HCV coat protein do not dissolve spontaneously unless they are treated to that end. In order to dissolve a protein having a hydrophobic portion in water, the method of converting a hydrophobic portion into a hydrophilic portion with a surfactant is well known. It is known, however, that certain salts such as guanidine chloride have a property of making refractory proteins water-soluble. Ions produced from salts (chaotropic agents) having such a property are called chaotropic ions, and as the anionic ions, guanidine ions, thiocyanate ions, iodine ions, periodate ions, perchlorate ions, and the like are known. Salts that generate these ions have been used for solubilization of refractory proteins. It was estimated that chaotropic ions have a function of efficiently releasing the antigens from the virus particles.

30 [0075] When a chaotropic ion is added, however, the secondary structure of proteins is disrupted causing the destruction of the epitope structure. Thus, when a probe such as antibody is added for the reaction of immune complex formation in the presence of a chaotropic ion as it is, binding with the antibody is weakened and the sensitivity decreases, which are thought to pose a serious problem.

35 [0076] On the other hand, the denaturing effect of chaotropic ions is mostly reversible, so that by weakening ionic strength by dialysis or dilution the denatured structure temporarily returns to the original structure. This poses another problem associated with the use of a treatment agent such as a chaotropic ion. That is, according to the desired treating method of the present invention, not only the virus particles present in the sample are efficiently released, but the high-affinity antibody that binds to the antigen present in the sample must be inactivated at the same time. Thus, solubilization with a chaotropic ion does not provide an adequate inactivation of the high-affinity antibody present in the sample, and, it is believed, the antibody adversely affects sensitivity.

40 [0077] Thus, the treating methods that employ chaotropic ions have two conflicting problems: in the condition in which a chaotropic ion can destroy a structure, the antigen-antibody reactions are inhibited, and on the other hand the effect of a chaotropic ion alone is not sufficient to inactivate antibodies that interfere with reactions in the sample, and in the condition in which the antigen-antibody reactions are not inhibited, contaminating antibodies can inhibit the reactions.

45 [0078] In order to solve these conflicting problems it is necessary to find a condition in which the epitopes of the antigen are destroyed reversibly and the functions of the contaminating antibodies in the sample are destroyed irreversibly.

50 [0079] As to the conditions in which antibody is inactivated, an alkali treatment, an acid treatment and the like are known. The acid treatment of serum can cause false-positive results since the treatment irreversibly denatures some of serum proteins resulting in the formation of precipitates that in most cases hinder pipetting after the treatment of samples, and precipitates that engulfed the denatured proteins are adsorbed to the solid phase at the time of measurement and thereby may be detected as a density. In addition, another problem arises because when the antigen of interest is nonspecifically engulfed in the precipitate, the amount of antigen that reacts with the probe decreases resulting in a

decrease in sensitivity.

[0080] The inventors of the present invention have found that the acid treatment combined with the guanidine treatment can resolve the problems associated with the acid treatment such as precipitate formation and the conflicting problems associated with the guanidine treatment, and thereby have completed the present invention. We have also found that it is further preferred to add a surfactant to the treatment agent comprising a chaotropic ion such as guanidine and an acidifying agent. As the acidifying agent, hydrochloric acid, sulfuric acid, acetic acid, trifluoroacetic acid, trichloroacetic acid, and the like are preferred.

[0081] As the surfactant, an amphoteric surfactant such as CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), CHAPSO (3-[cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propanesulfonate), dodecyl-N-betaine, 3-(dodecyldimethylammonio)-1-propanesulfonate, or the like, and a nonionic surfactant such as a polyoxyethylene isooctylphenyl ether, for example Triton X100; a polyoxyethylene nonylphenyl ether, for example NP 40; a polyoxyethylene sorbitol ester, for example Tween 20; a polyoxyethylene dodecyl ether, for example Brij 58; octyl glucoside, or the like is preferred. Furthermore, an agent such as urea that partially destroys a higher structure of proteins by weakening hydrogen ion bonding may be added therein.

[0082] Especially, it is more preferred to use guanidine hydrochloride at 2 M or greater, Triton X100 at 2% or greater, and Tween 20 at 0.02% or greater at a temperature of 4 °C to 45 °C.

[0083] In any of the embodiments, it is evident that a virus antigen can be released in the form of a probe, i.e. a state suitable for the so-called immunoassay that uses antibody as a probe, from the sample containing virus particles having a structure similar to that of HCV or HBV by using the treating method of the present invention. Viruses having a structure similar to that of HCV or HBV as used herein are viruses that form virus particles having a structure composed of proteins in which the genomic RNA or DNA has been packed and the membrane protein or the lipid membrane surrounding it. The viruses include, for example, flaviviruses that are related to HCV, retroviruses such as human immunodeficiency virus (HIV), and the like. Furthermore, those having DNA as the genome like HBV are also included when they have a similar structure.

Exposure of virus antigen

[0084] According to the second embodiment of the present invention which relates to a method of detecting the virus antigen in a sample collected during the window period, antibody to the virus antigen has not been formed yet and so the disruption of the virus particle to expose the virus antigen is sufficient and there is no need to destroy antibodies present in the sample. Thus, pretreatment of samples described above is not necessary and the presence of a virus particle-disrupting agent to expose the virus particle is sufficient. Especially, the virus particle-disrupting agent is essential for the virus antigens present in the virus particle.

[0085] It is believed that virus particles in general have a structure in which a nucleic acid as the genome and a core antigen form a complex forming a particle and said particle is coated by a coat comprising a lipid membrane and an envelope protein. It is also believed that in the blood they are present in the form of a complex with a low density lipoprotein, an antibody to the virus, and the like. Thus, a probe cannot recognize or bind to the virus antigens, specifically the antigens in the virus particle, with the particles as they are present in the blood. In order to detect the virus antigens, therefore, they must be treated by, for example, removing these structures surrounding the virus particle so that the virus particle can be recognized by a probe.

[0086] Thus, the present invention also provides a reaction condition under which the virus antigen in the virus particle contained in the sample is exposed so as to be recognized by the probe for recognizing the virus particle, a method of the reaction comprising the system of performing the reaction, and a reagent containing the system of performing the reaction.

[0087] A reaction system suitable for antigen detection in the system provided by the present invention comprises a condition which is mild enough to retain the function of the antibody against the epitopes of the virus antigen but which can fully expose the area recognized by the antibody, a virus antigen-recognizing probe, from the virus particle which is a complicated structure present in the sample.

[0088] For HCV, it has already been demonstrated that the core antigen can be detected by treating the virus particles isolated by ultra-centrifugation (Takahashi et al., 1992, J. Gen. Virol. 73: 667-672) and HCV particles precipitated by aggregation with polyethylene glycol using a nonionic surfactant such as Tween 80 or Triton X100 (Kashiwakuma et al., 1996, J. Immunological Methods, 190: 79-89). In the former, however, the detection sensitivity is not high enough and there remains a question as to whether the antigen has fully been exposed. In the latter also, the antibody has been inactivated by the addition of another treatment agent, and there is no mention of the effect of the surfactant per se.

[0089] According to the present invention, the conditions were first investigated centering on the surfactant. Accordingly, it was found that by using a composition based on the surfactant, an efficient detection of the antigen in the virus particle was attained, without employing any procedure of pretreatment such as centrifugation or heating, by only diluting the sample in the reaction solution.

[0090] It is necessary to effectively extract the virus antigens from the virus particles, and to suppress interactions with a variety of substances in the serum, thereby to provide a condition under which the probe can efficiently react with the antigen. As an effective surfactant used in this case, there may be mentioned a surfactant having both an alkyl radical of 10 or more carbons and a secondary, tertiary, or a quaternary amine in one molecule, or a nonionic surfactant.

5 [0091] In the above surfactant having an alkyl radical and a secondary, tertiary, or a quaternary amine, the alkyl group is preferably a straight-chain alkyl group and the number of carbon atoms therein is preferably 10 or greater, and more preferably 10 to 20. As the amine, a tertiary or quaternary amine (ammonium) is preferred. The specific surfactants include dodecyl-N-sarcosinic acid, dodecyl trimethyl ammonium, cetyltrimethyl ammonium, 3-(dodecyldimethylammonio)-1-propane sulfonate, 3-(tetradecyldimethylammonio)-1-propane sulfonate, dodecyl pyridinium, cetyl pyridinium, decanoyl-N-methyl glucamide (MEGA-10), dodecyl-N-betaine, and the like. Dodecyl-N-sarcosinic acid and dodecyl trimethyl ammonium are preferred.

10 [0092] As the nonionic surfactant mentioned above, those having a hydrophilic-lipophilic balance of 12 to 14 are preferred, and polyoxyethylene isooctylphenylethers such as Triton X100 and Triton X114, or polyoxyethylene nonylphenylethers such as Nonidet P40, Triton N101, and Nikkol NP are preferred.

15 [0093] According to the present invention, the above two types of surfactants may be used alone, but combined use of them is more preferable and a synergistic effect can be obtained by the combined use.

[0094] Additional components that change the aqueous environment such as urea may be added.

Monoclonal antibody as a probe in the present invention

20 [0095] The gene fragment of the structural protein of HCV as used herein means a gene fragment containing the core region of the structural protein of HCV and a DNA fragment having at least a base sequence encoding a polypeptide containing an amino acid sequence from 1 to 160 from the N-terminal of HCV. Specifically, it is a gene fragment comprising a base sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

25 [0096] The polypeptide having the activity of HCV antigen as used herein means a fusion polypeptide or a polypeptide that immunologically reacts with the anti-HCV antibody, and can be used as an antigen for constructing a hybridoma and a monoclonal antibody obtained therefrom of the present invention. Specifically, it is a polypeptide having the activity of the HCV antigen comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or a polypeptide having the activity of the HCV antigen comprising a portion of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or a polypeptide having an additional 30 amino acid sequence attached to the N-terminal or C-terminal thereof.

35 [0097] The monoclonal antibody of the present invention against the above fusion polypeptide and the polypeptide having amino acid sequences as shown in SEQ ID NO: 3 - 6 can be readily constructed by a person skilled in the art. The production of monoclonal antibody by a hybridoma is well known. For example, BALB/c mice may be periodically immunized intraperitoneally or subcutaneously with a fusion polypeptide or polypeptide (hereinafter referred to as the present antigen) mentioned above as a single antigen or as an antigen combined with BSA, KLH, or the like, singly or in a mixture with an adjuvant such as Freund's complete adjuvant. When antibody titer in the serum has increased, the present antigen is administered to the tail vein as a booster. After the spleen has been aseptically isolated, it is fused with a suitable myeloma cell line to obtain a hybridoma. This method can be carried out according to the method of Kohler and Milstein (Nature 256: 495-497, 1975).

40 [0098] The hybridoma cell line obtained by the above method may be cultured in a suitable culture liquid, and the hybridoma cell lines producing the antibodies that exhibit specific reactions to the present antigen are selected and cloned. For the cloning of the antibody-producing hybridomas, there may be employed the soft agar method (Eur. J. Immunol. 6: 511-5198, 1976) in addition to the limit dilution method. The monoclonal antibodies thus produced are purified by such methods as column chromatography using protein A.

45 [0099] In addition to the above monoclonal antibodies, molecules used as a probe may be generated. For example, recombinant antibody has been described in detail in a review by Hoogenboon (Trends in Biotechnology, 15: 62-70, 1997).

Detection system using a probe

50 [0100] The monoclonal antibodies produced according to the present invention are used as test reagents for the detection and quantitation of HCV structural proteins in an enzyme-linked immunosorbent assay, an enzymeimmunoassay, an enzyme immunodot assay, a radioimmunoassay, an aggregation-based assay, or another well known immunoassay. When labeled antibodies are used for the detection, fluorescent compounds, chemiluminescent compounds, enzymes, chromogenic substances, and the like may be used as the labeled compounds.

55 [0101] For example, when a sandwich reaction system-based method is used to detect the virus antigen in a sample (serum), the diagnostic kit to be used comprises one or more monoclonal antibodies coated onto the solid support (for example, an inner wall of a microtiter well), one or more monoclonal antibodies or a fragment thereof bound to the

labeled substance. Any combination of a monoclonal antibody immobilized onto the solid support and a labeled monoclonal antibody may be used, and the combinations that provide high sensitivity may be selected.

[0102] Solid supports that may be used include, for example, microtiter plates, test tubes, and capillaries made of polystyrene, polycarbonate, polypropylene, or polyvinyl, beads (latex beads, red blood cells, metal compounds etc.), membranes (liposome etc.), filters, and the like.

Effects of the Invention

[0103] In accordance with the method of the present invention, virus antigens can be conveniently released from the virus particle in a state suitable for an immunoassay that effects detection using antibody as a probe. Furthermore, by treating a sample containing the virus particle in accordance with the present invention, a simple and sensitive detection and quantitation of virus antigens can be effected by an immunoassay in which the antigen is detected using antibody etc. as a probe. It is also possible to create a kit, an assay kit and a diagnostic reagent that determines the presence or absence of viruses and quantitates viruses in the sample using an immunoassay that employs the sample treating method of the present invention.

Examples

[0104] The following examples illustrate the present invention, but they should not be construed to limit the scope of the present invention.

Example 1. Expression and purification of a HCV-derived polypeptide

(A) Construction of an expression plasmid

[0105] A plasmid corresponding to the core region of HCV was constructed as follows: one microgram each of DNA of plasmids pUC • C11-C21 and pUC • C10-E12 obtained by integrating the C11-C21 clone and the C10-E12 clone (Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 6 (1994)-38765) respectively, into pUC119 was digested in 20 µl of a restriction enzyme reaction solution [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 100 mM NaCl, 15 units of EcoRI and 15 units of Clal enzyme] and the restriction enzyme reaction solution [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 50 mM NaCl, 15 units of Clal and 15 units of KpnI enzyme] at 37°C for one hour each, and then was subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis to purify about 380 bp of EcoRI-Clal fragment and about 920 bp of Clal-KpnI fragment.

[0106] To the two DNA fragments and a vector obtained by digesting pUC119 with EcoRI and KpnI was added to 5 µl of 10 x ligase buffer solution [660 mM Tris-HCl, pH 7.5, 66 mM MgCl₂, 100 mM dithiothreitol, 1 mM ATP], 1 µl of T4 Igase (350 units/µl) and water to make total volume 50 µl, and then was incubated at 16 °C overnight to carry out a ligation reaction. Using this plasmid, E. coli JM109 was transformed to obtain the plasmid pUC • C21-E12.

[0107] One nanogram of the DNA of this plasmid, pUC • C21-E12, was subjected to PCR using two primers: 5'-GAAT-TCATGGGCACGAATCCTAAA-3' (SEQ ID NO: 7), and 5'-TTAGTCCTCCAGAACCCGGAC-3' (SEQ ID NO: 8). PCR was carried out using the GeneAmpTM (DNA Amplification Reagent Kit, manufactured by Perkin Elmer Cetus) under the condition of DNA denaturation at 95 °C for 1.5 min, annealing at 50 °C for 2 min, and DNA synthesis at 70 °C for 3 min. DNA fragments thus obtained were separated on 0.8% agarose gel electrophoresis and were purified by the glass powder method (Gene Clean).

[0108] On the other hand, pUC19 was digested with SmaI, and the DNA fragment obtained by PCR was added to 5 µl of 10 x ligase buffer solution [660 mM Tris-HCl, pH 7.5, 66 mM MgCl₂, 100 mM dithiothreitol, 1 mM ATP], 1 µl of T4 Igase (350 units/µl) and water to make total volume 50 µl, and then were incubated at 16 °C overnight to carry out a ligation reaction. Using this plasmid, E. coli JM109 was transformed to obtain the plasmid pUC • C21-E12 • SmaI. One microgram of this plasmid DNA was digested in 20 µl of the restriction enzyme reaction solution [150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6 mM MgCl₂, 15 units of EcoRI and 15 units of BamHI enzyme] and then was subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis to separate about 490 bp of EcoRI-BamHI fragment, which was purified by the glass powder method.

[0109] Then 1 µg of the DNA of the expression vector Trp • TrpE (Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 5(1993)-84085) was digested in 20 µl of the restriction enzyme reaction solution [150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6 mM MgCl₂, 15 units of EcoRI and 15 units of BamHI enzyme] at 37 °C for 1 hour. To the reaction mixture was added 39 µl of water and then was heated at 70 °C for 5 minutes. Thereafter 1 µl of a bacterial alkaline phosphatase (BAP) was added and incubated at 37 °C for 1 hour.

[0110] Phenol was added to the reaction mixture for phenol extraction. The aqueous layer thus obtained was precipitated with ethanol and the precipitate obtained was dried. One microgram of DNA of the EcoRI-BamHI-treated vector

obtained and the above core 140 fragment were added to 5 µl of 10 x ligase buffer solutin [660 mM Tris-HCl, pH 7.5, 66 mM MgCl₂, 100 mM dithiothreitol, 1 mM ATP], 1 µl of T4 Igase (350 units/µl) and water to make total valme 50 µl, and were incubated overnight at 16 °C to carry out a ligation reaction.

[0111] Using 10 µl of this reaction mixture, E. coli strain HB101 was transformed. The sensitive E. coli strain used for transformation can be constructed by the calcium chloride method [Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159-162 (1970)]. The transformed E. coli was plated on a LB plate (1% tryptophan, 0.5% NaCl, 1.5% agar) containing 25 µg/ml ampiciliin and was incubated overnight at 37 °C. Using an inoculating loop, one loopful of a the bacterial colony that has formed on the plate was transferred to an LB culture medium containing 25 µg/ml ampicillin and incubated overnight at 37 °C. One and a half milliliters of the bacterial culture was centrifuged to collect the cells and then the plasmid DNA was subjected to minipreparation using the alkali method [Manniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)].

[0112] Then 1 µg of the DNA of the plasmid DNA thus obtained was digested in 20 µl of the restriction enzyme reaction solution [150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6 mM MgCl₂, 15 units of EcoRI and 15 units of BamHI enzyme] at 37 °C for 1 hour, and then was subjected to agarose gel electrophoresis. The Trp • TrpE core 160 expression plasmid that produced about 490 bp of EcoRI-BamHI fragment were selected.

(B) Expression and purification of a polypeptide encoded by the clone core 160

[0113] E. coli strain HB101 having an expression plasmid Trp • TrpE core 160 was inoculated to 3 ml of 2YT medium (1.6% trypton, 1% yeast extracts, 0.5% NaCl) containing 50 µg/ml of ampicillin, and was cultivated at 37 °C for 9 hours. One milliliter of the culture was passaged to 100 ml of M9-CA medium (0.6% Na₂HPO₄, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 0.1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 0.5% casamino acid, 0.2% glucose) containing 50 µg/ml of ampicillin, and cultured at 37 °C. Indol acrylate was added to a final concentration of 40 mg/l at OD600 = 0.3 and was cultured for more 16 hours. The culture was centrifuged to collect the cells.

[0114] To the cells was added 20 ml of the buffer A [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 30 mM NaCl] to suspend them. The suspension was again centrifuged to obtain 2.6 g of expression cells. The cells thus obtained were suspended in 10 ml of the buffer A. After disrupting the membrane of the E. coli with sonication, it was centrifuged to obtain an insoluble fraction containing a fusion polypeptide of a polypeptide encoded by HCV cDNA and TrpE. To the fraction was added 10 ml of the buffer A containing 6 M urea to solubilize and extract the fusion polypeptide. The solubilized extract was subjected to ion exchange column chromatography using S-Sepharose to purify the fusion polypeptide.

Example 2. Method of constructing a hybridoma

[0115] The fusion polypeptide (TrpC11) prepared by the method described above was dissolved in 6 M urea, and then diluted in 10 mM phosphate buffer, pH 7.3, containing 0.15 M NaCl to a final concentration of 0.2 to 1.0 mg/ml, and mixed with an equal amount of adjuvant (Titermax) to make a TrpC11 suspension. This suspension prepared at 0.1 to 0.5 mg/ml of TrpC11 was intraperitoneally given to 4 to 6 week old BALB/c mice. Similar immunization was conducted every two weeks and after about two more weeks 10 µg of TrpC11 dissolved in physiological saline was administered through the tail vein.

[0116] Three days after the last booster, the spleen was aseptically isolated from the immunized animal and was cut into pieces using scissors, which were then crumbed into individual cells and washed three times with the RPMI-1640 medium. After washing, a mouse myeloma cell line SP2/0Ag14 at the logarithmic growth phase as described above, 2.56 × 10⁷ of said cells and 1.64 × 10⁸ spleen cells were mixed in a 50 ml centrifuge tube. The mixture was centrifuged at 200 × g for 5 minutes, the supernatant was removed, and 1 ml of the RPMI-1640 medium containing 50% polyethylene glycol (PEG) 4000 (manufactured by Merck) was added to the precipitate, and 10 ml of the RPMI-1640 medium was further added to carry out cell fusion.

[0117] After PEG was removed by centrifugation (200 × g, 5 minutes), the fused cells were cultured in a RPMI1640 medium containing 10% bovine serum, hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (hereinafter referred to as HAT) in a 96-well plate for about 10 days to grow only hybridomas. Then, the clones producing the antibody of interest were detected by the ELISA method to obtain the hybridomas that produce monoclonal antibody having the desired reaction specificity of the present invention.

[0118] The hybridomas thus obtained were monocloned according to the conventional limiting dilution method, and the hybrodomas obtained were designated HC11-11, HC11-14, HC11-10, and HC11-3, and HC11-7. Said four hybridomas were deposited with the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, on July 4, 1997, as FERM BP-6005, FERM BP-6006, FERM BP-6004, FERM BP-6002, AND FERM BP-6003, respectively.

Example 3. Construction of monoclonal antibody

[0119] The hybridomas obtained in the method of Example 2 were inoculated to the abdominal cavity of mice treated with pristane etc., and the monoclonal antibodies produced in the ascites fluid was collected. The monoclonal antibodies were purified using the Protein A-bound Sepharose column to separate IgG fractions.

[0120] By an immunoassay using rabbit anti-mouse Ig isotype antibody (manufactured by Zymed), the isotype of each of the monoclonal antibodies C11-14, C11-11, C11-10, C11-7, and C11-3 produced from the above five hybridomas, respectively, was found to be IgG2 for C11-10 and C11-7; and IgG1 for C11-11, C11-14, and C11-3. For the five monoclonal antibodies obtained, epitope analysis was conducted using the synthetic peptides composed of 20 amino acids synthesized according to the sequence derived from the HCV core region. The result indicated, as shown in Table 1, that they were the monoclonal antibodies that specifically recognize part of the core region.

Table 1

Antibody	Recognition site
C11-14	⁴¹ Gly- ⁵⁰ Arg (SEQ ID NO: 4)
C11-10	²¹ Asp- ⁴⁰ Arg (SEQ ID NO: 3)
C11-3	¹⁰⁰ Pro- ¹²⁰ Gly (SEQ ID NO: 5)
C11-7	¹¹¹ Asp- ¹³⁰ Phe (SEQ ID NO: 6)
C11-11	¹⁰⁰ Pro- ¹²⁰ Gly (SEQ ID NO: 5)

Example 4. Study on the condition of sample treatment

1) SDS concentration

[0121] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution containing a different concentration of SDS and 0.6% CHAPS. The mixtures were then placed in an incubator set at 56 °C and were treated for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures was used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 1 with the SDS concentration at the time of treatment taken as the abscissa.

2) CHAPS concentration

[0122] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution containing a different concentration of CHAPS and 5% SDS. The mixtures were then placed in an incubator set at 56 °C and were treated for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures was used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 2 with the CHAPS concentration at the time of treatment taken as the abscissa.

3) Urea concentration

[0123] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution (5% SDS, 0.6% CHAPS) containing a different concentration of urea. The mixtures were then placed in an incubator set at 56 °C and were treated for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures was used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 3 with the urea concentration at the time of treatment taken as the abscissa.

4) Triton X100 concentration

[0124] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution (5% SDS, 0.6% CHAPS, 6 M urea) containing a different concentration of Triton X100. The mixtures were then placed in an incubator set at 56 °C and were treated for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures was used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 4 with the Triton X100 concentration at the time of treatment taken as the abscissa.

5) Reaction temperature

[0125] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution (5% SDS, 0.6% CHAPS, 6 M urea, 0.75% Triton X100). The mixtures were treated at 4 °C, room temperature (23 °C), 5 37 °C, 45 °C, 56 °C, and 70 °C for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures were used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 5.

Assay methods

[0126] Samples obtained in the study on the condition of serum treatment were each evaluated using the respective assay method described below. Thus, an anti-HCV core antigen monoclonal antibody (a mixture of equal amounts of antibody C11-3 and C11-7) was diluted to a final total concentration of 6 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6, and 100 µl each of the dilutions was dispensed per well of a 96-well microtiter plate (manufactured by Nunc). After the plate was incubated overnight at 4 °C, it was washed twice with 0.35 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 0.15 M NaCl. Then, 0.35 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.35, containing 0.5% casein-Na (hereinafter referred to as the blocking solution) was added and the plate was further incubated at room temperature for 2 hours. [0127] After the blocking solution was removed, 160 µl of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 0.15 M NaCl, 1% BSA, 0.5% casein-Na, and 0.05% Tween 20, and samples for measurement obtained by the serum treating method were added into respective wells. The plate was then incubated at room temperature for 2 hours, washed five times with 300 µl of the wash solution. Then 100 µl of a peroxidase (POD)-labeled monoclonal antibody (a mixture of equal amounts of C11-10 and C11-14) was added and was incubated at room temperature for 30 minutes. After the incubation was over, the plate was washed five times with 300 µl of the above wash solution. One hundred microliters of the substrate (ortho-phenylene diamine, hereinafter referred to as OPD) solution was added to the plate and the plate was incubated at room temperature for 30 minutes, followed by the addition of 100 µl of 2 N sulfuric acid solution. Absorbance was measured at a wavelength of 492 nm (OD492) with the absorbance at 630 nm as a reference. Each treatment condition was optimized, as shown in Figs. 1 to 4. It was difficult to detect the core antigen in the untreated samples, but such a simple treatment enabled the detection of the core antigen. Especially, it was shown, the core antigen can be satisfactorily detected by employing the condition of SDS at 0.5% or greater, CHAPS at 0.1% or greater, urea at 1M or greater, and Triton X100 at 0.1 to 0.75%, and a temperature range of 4 °C to 70 °C.

30 Example 5. The detection and assay method of the core antigen in the structural region (1)

[0128] To 100 µl of serum was added 100 µl of the treatment solution (5% SDS, 0.6% CHAPS, 6 M urea, 0.75% Triton X100). It was then placed in an incubator set at 56 °C and was treated for 30 minutes, and 120 µl of the treated mixture was used as a sample.

[0129] An anti-HCV core antigen monoclonal antibody (a mixture of equal amounts of C11-3 and C11-7) was diluted to a final total concentration of 6 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6, and 100 µl each of the diluted mixture was dispensed per well of a 96-well microtiter plate (manufactured by Nunc). After the plate was incubated overnight at 4 °C, it was washed twice with 0.35 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 0.15 M NaCl. Then, 0.35 ml of the blocking solution was added and the plate was further incubated at room temperature for 2 hours.

[0130] After the blocking solution was removed, 120 µl of the reaction buffer and samples for measurement obtained in the above treating method were added into respective wells, and incubated at room temperature for 2 hours. The plate was washed five times with 300 µl of the wash solution, and then 100 µl of a peroxidase (POD)-labeled monoclonal antibody (a mixture of equal amounts of C11-10 and C11-14) was added to the plate and the plate was incubated at room temperature for 30 minutes. The plate was washed five times with 300 µl of the wash solution and 100 µl of the substrate (OPD) solution was added, and incubated at room temperature for 45 minutes, followed by the addition of 100 µl of 2 N sulfuric acid solution. Absorbance was measured at a wavelength of 492 nm (OD492) with the absorbance at 630 nm as a reference. As a standard serum, the panel serum 50, defined as 1 U/ml, was serially diluted in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 1% BSA, which was similarly treated and measured.

[0131] Fig. 6 shows a dilution line of the panel serum 50 used as a standard serum. The core antigen in the sample was determined in a dose-dependent manner and could be detected to a level of about 0.5 mU/ml. It was demonstrated, therefore, that by combining a very simple method of sample treatment and the monoclonal antibody of the present invention, the HCV core antigen can be detected or quantitated.

Example 6. Detection and quantitation of the HCV core antigen (2)

A method using an alkaline phosphatase-labeled monoclonal antibody

- 5 [0132] A 96-well black microtiter plate (Nunc) as the solid carrier, an alkaline phosphatase-labeled monoclonal antibody as the labeled antibody, and CDPstar (Emerald II as the sensitizer) as the substrate were used. A dilution line of the panel serum 50 used as a standard serum is shown in Fig. 7, in which the core antigen in the sample was determined in a dose-dependent manner and could be detected to a level of about 0.5 mU/ml. It was demonstrated, therefore, that the method using an alkaline phosphatase-labeled monoclonal antibody can also detect or quantitate the HCV core antigen.
- 10

Example 7. Study on additives for suppressing sensitivity reduction in the hemolyzed serum

- 15 [0133] When serum components were tested on the effect on sensitivity, it was found that the addition of hemoglobin drastically reduced sensitivity. It was thought that the reduction was caused by the heme released from the denatured hemoglobin produced by pretreatment using a pretreatment agent containing SDS, CHAPS, or Triton X100. Thus, additives that could reduce the effect of the denatured hemoglobin were tested by adding them to the pretreatment agent.
- 20 [0134] The effect of urea addition was studied by adding urea to the model samples that were created by adding a high concentration hemoglobin (manufactured by Kokusai Shiyaku: Kansho Check) to a HCV core antigen positive serum (panel serum No. 3), and by determining the core antigen according to Example 6. The level of activity of the core antigen in the 430 mg/dl hemoglobin addition group relative to 100% of the no-hemoglobin addition group used as the control is shown in Table 2. It was confirmed that when no urea is added, the level of activity of the core antigen in the hemoglobin addition group decreased by 30%, but by increasing the amount of added urea the level of activity of the core antigen in the hemoglobin addition group increased and interference by hemoglobin decreased.
- 25

Table 2

Suppressive effect of urea on interference by hemoglobin	
Additive	% Relative to control
No addition	30.0
0.5 M urea	36.3
1 M urea	39.7
2 M urea	43.0
3 M urea	48.8
4 M urea	53.7

- 30 [0135] On the other hand, since there is a possibility of the interaction of each of amino acids with the heme and the buffering effect by the amino group and the carboxyl group, various amino acids were added and the degree of the effect was examined. The result is shown in Table 3.
- 35

Table 3

Suppressive effect of various amino acids on interference by hemoglobin	
Additive	% Relative to control
No addition	22.7
0.1 M histidine	53.7
0.1 M tryptophan	70.8
0.1 M phenylalanine	45.8
0.1 M leucine	25.9

Table 3 (continued)

Suppressive effect of various amino acids on interference by hemoglobin		
	Additive	% Relative to control
5	0.1 M glutamine	36.1
10	0.1 M lysine	42.1
15	0.1 M arginine	31.4
	0.1 M glutamic acid	49.8
	0.1 M glycine	39.1
	0.1 M proline	31.2
	0.1 M serine	32.5

[0136] Tryptophan and histidine exhibited the most potent suppressive effect on interference. The dose-dependency of the suppressive effect on interference was studied and the result is shown in Table 4.

20

Table 4

Suppressive effect of histidine and tryptophan on interference by hemoglobin		
	Additive	% Relative to control
25	No addition	24.2
30	0.05 M histidine	49.3
35	0.1 M histidine	59.4
	0.15 M histidine	74.5
	0.2 M histidine	77.0
	0.05 M tryptophan	58.7
	0.1 M tryptophan	71.5
	0.15 M tryptophan	77.9
40	0.2 M tryptophan	89.0

[0137] Since the heme is coordinated by a side chain in hemoglobin and retained in hemoglobin, the effect was suggested to be attributable to the side chain. Accordingly, the effect of imidazole, a side chain in histidine, and indoleacrylic acid containing an indole ring, a side chain in tryptophan, were studied and the result is shown in Table 5.

45

Table 5

Suppressive effect of imidazole and indoleacrylic acid on interference by hemoglobin		
	Additive	% Relative to control
50	No addition	22.1
55	0.05 M imidazole	35.2
	0.1 M imidazole	42.0
	0.15 M imidazole	58.8
	0.2 M imidazole	70.7

Table 5 (continued)

Suppressive effect of imidazole and indoleacrylic acid on interference by hemoglobin	
Additive	% Relative to control
5 mM indoleacrylic acid	50.4
10 mM indoleacrylic acid	69.0
20 mM indoleacrylic acid	90.3
30 mM indoleacrylic acid	96.8

[0138] When indole or indoleacrylic acid was added to the reaction, a dose-dependent suppressive effect of interference by hemoglobin was observed as with the addition of amino acids. This indicated that by adding to the reaction a substance that contains an imidazole ring, for example histidine, or an indole ring, for example tryptophan, the sensitive detection of the core antigen can be attained even for the samples that contains hemoglobin.

[0139] The effect of combination of the above additives was studied. The result is shown in Table 8. By combining histidine and tryptophan, recovery of 90% or greater was obtained, and the addition of urea further increased detection sensitivity.

Table 6	
Additive	% Relative to control
0.1 M histidine/0.1 M tryptophan	91.1
4 M urea/0.1 M Tris/0.1 M histidine	112.6

Example 8. Analysis the molecular form recognized in the serum treatment and in the assay method

[0140] Each method of serum treatment was used to treat 0.25 ml of the panel serum 13. The treated serum was fractionated on a gel filtration column (Superdex 200HR, 1 x 30), and anti-core immunological activity in the fractions was measured. The result is shown in Table 8. The figure suggested that the molecules having a molecular weight of about 20 to 30 kDa are being recognized and that the core antigen in the virus has been released through the disruption of the virus and the inactivation of the anti-core antibody in the serum by the above-mentioned pretreatment.

Example 9. Assay method of the core antigen in the HCV structural region in the serum

[0141] Sera determined to have 10^3 to 10^7 copies/ml of HCV-RNA using AmpliCore HCV Monitor kit (Roche), a PCR method, and normal human sera were used to quantitate the HCV core antigen in the sera using the method described above.

[0142] As a standard serum the panel serum 50 (defined as 1 U/ml) was serially diluted in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 1% BSA, and treated in a similar manner. The result is shown in Table 7. Of the samples tested, the core antigen in all the normal human sera was below the detection limit and could be detected in all of the PCR-positive samples. The correlation is shown in Fig. 9, which revealed that the correlation with the PCR method was also as high as 0.8 or greater.

Table 7

Levels of HCV-RNA and the core antigen		
Sample #	RNA (K copies (ml)	core antigen (mU/ml)
Normal human serum 1	-	N.D.
2	-	N.D.
3	-	N.D.
4	-	N.D.

Table 7 (continued)

Levels of HCV-RNA and the core antigen			
	Sample #	RNA (K copies/ml)	core antigen (mU/ml)
5	5	-	N.D.
10	Panel serum 81	1.6	2.1
	80	8	2.1
15	82	8	8.5
	33	16	3.7
20	31	30	37.0
	26	87	266.7
25	39	97	63.8
	41	170	116.1
	16	400	133.7
	50	1000	1000
	45	1300	277.3
	13	1600	1806
	N.D. : Not detected		

Example 10. Study on the condition of sample treatment Study on treatment conditions

1) Guanidine hydrochloride concentration

[0143] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution containing a different concentration of guanidine hydrochloride and 0.5 N HCl. The mixtures were treated at room temperature for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures was used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 10 with the guanidine hydrochloride concentration at the time of treatment taken as the abscissa.

2) Triton X100 concentration

[0144] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution containing a different concentration of Triton X100 (6 M guanidine hydrochloride, 0.5 N HCl). The mixtures were treated at room temperature for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures was used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 11 with the Triton X100 concentration at the time of treatment taken as the abscissa.

45 3) Tween 20 concentration

[0145] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution containing a different concentration of Triton X100 (6 M guanidine hydrochloride, 0.5 N HCl, 12.5% Triton X100). The mixtures were treated at room temperature for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures was used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 12 with the Tween 20 concentration at the time of treatment taken as the abscissa.

4) Reaction temperature

[0146] To 100 µl of a normal human serum and HCV-RNA-positive sera were added 100 µl of the treatment solution (6 M guanidine hydrochloride, 0.5 N HCl, 12.5% Triton X, 0.75% Tween 20). The mixtures were treated at 4 °C, room temperature (23 °C), 37 °C, and 45 °C for 30 minutes, and 80 µl each of the treated mixtures were used as a sample. The result obtained using the assay method described below is shown in Fig. 13.

Assay methods

- [0147] Samples obtained in the study on the condition of serum treatment were each evaluated using the respective assay method described below. Thus, an anti-HCV core antigen monoclonal antibody (a mixture of equal amounts of antibody C11-14 and C11-11) was diluted to a final total concentration of 6 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6, and 100 µl each of the dilutions was dispensed per well of a 96-well microtiter plate (manufactured by Nunc). After the plate was incubated overnight at 4 °C, it was washed twice with 0.35 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 0.15 M NaCl. Then, 0.35 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.35, containing 0.5% casein-Na (hereinafter referred to as the blocking solution) was added and the plate was further incubated at room temperature for 2 hours.
- [0148] After the blocking solution was removed, 160 µl of the mixture of 140 µl of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 0.15 M NaCl, 1% BSA, 0.5% casein-Na, and 0.05% Tween 20, and 20 µl of 1 M Tris (hereinafter referred to as the reaction buffer), and samples for measurement obtained by the above-mentioned serum treating method were added into respective wells, incubated at room temperature for 2 hours, washed five times with 300 µl of the wash solution, and then 100 µl of the peroxidase (POD)-labeled monoclonal antibody (C11-10) was added and was incubated at room temperature for 30 minutes. After the incubation was over, the plate was washed five times with 300 µl of the above wash solution. One hundred microliters of the substrate (ortho-phenylene diamine, hereinafter referred to as OPD) solution was added to the plate and the plate was incubated at room temperature for 30 minutes, followed by the addition of 100 µl of 2 N sulfuric acid solution. Absorbance was measured at a wavelength of 492 nm (OD492) with the absorbance at 630 nm as a reference.
- [0149] Each treatment condition was optimized as shown in Figs. 10 to 13. It was difficult to detect the core antigen in the untreated samples, but such a simple treatment drastically enabled the detection of the core antigen. In any case no enhancement in signals was observed in the healthy humans. It was also shown that the core antigen can be satisfactorily detected by employing the condition of guanidine hydrochloride at 2 M or greater and Triton X100 at 0.2% or greater, and a temperature range of 4 °C to 45 °C.

Example 11. The detection and assay method of the core antigen

- [0150] To 100 µl of serum was added 100 µl of a treatment solution (6 M guanidine hydrochloride, 0.5 N HCl, 12.5% Triton X100, 0.75% Tween 20). It was treated at room temperature for 30 minutes, and 100 µl of the treated mixture was used as a sample.
- [0151] An anti-HCV core antigen monoclonal antibody (a mixture of equal amounts of C11-14 and C11-11) was diluted to a final total concentration of 6 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6, and 100 µl each of the diluted mixture was dispensed per well of a 96-well microtiter plate (manufactured by Nunc).
- [0152] After the plate was incubated overnight at 4 °C, it was washed twice with 0.35 ml of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 0.15 M NaCl. Then, 0.35 ml of the blocking solution was added and the plate was further allowed to stand at room temperature for 2 hours. After the blocking solution was removed, 150 µl of the reaction buffer and samples for measurement obtained in the above treating method were added into respective wells, and incubated at room temperature for 2 hours.
- [0153] The plate was washed five times with 300 µl of the wash solution, and then 100 µl of a peroxidase (POD)-labeled monoclonal antibody (C11-10) was added to the plate. The plate was incubated at room temperature for 30 minutes. Then the plate was washed five times with 300 µl of the wash solution, and 100 µl of the substrate (OPD) solution was added. After incubating the plate at room temperature for 45 minutes, 100 µl of 2 N sulfuric acid solution was added. Absorbance was measured at a wavelength of 492 nm (OD492) with the absorbance at 630 nm as a reference. As a standard serum, the panel serum 50, defined as 1 U/ml, was serially diluted in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 1% BSA, which was similarly treated and measured.
- [0154] Fig. 14 shows a dilution line of the panel serum 50 used as a standard serum. The core antigen in the sample was determined in a dose-dependent manner and could be detected to a level as low as about 0.5 mU/ml. It was demonstrated, therefore, that by combining a very simple method of sample treatment and the monoclonal antibody of the present invention, the HCV core antigen can be detected or quantitated.

Example 12. Analysis the molecular form recognized in the serum treatment and in the assay method

- [0155] Each method of serum treatment was used to treat 0.25 ml of the panel serum 13. The treated serum was fractionated by a gel filtration column (Superdex 200HR, 1 x 30), and anti-core immunological activity in the fractions was measured. The result is shown in Table 15. The figure suggested that molecules having a molecular weight of about 20 to 30 kDa are being recognized and that the core antigen in the virus has been released from various interactions through the disruption of the virus and the inactivation of the anti-core antibody in the serum by the above-mentioned pretreatment.

Example 13. Assay method of the core antigen in the serum

[0156] Sera determined to have 10^3 to 10^7 copies/ml of HCV-RNA using AmpliCore HCV Monitor kit (Roche), a PCR method, and normal human sera were used to quantitate the HCV core antigen in the sera using the method described above.

[0157] As a standard serum the panel serum 50 (defined as 1 U/ml) was serially diluted in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 1% BSA, and treated in a similar manner. The result is shown in Table 8. Of the samples tested, the core antigen in all the normal human sera was below the detection limit and could be detected in all of the PCR-positive samples. The correlation is shown in Fig. 16, which revealed that the correlation with the PCR method was also as high as 0.8 or greater.

Table 8

Levels of HCV-RNA and the core antigen			
	Sample #	RNA (K copies/ml)	Core antigen (mU/ml)
15	Normal human serum 1	-	N.D.
	2	-	N.D.
	3	-	N.D.
	4	-	N.D.
	5	-	N.D.
	6	-	N.D.
	7	-	N.D.
20	Panel serum 1	50	166.4
	7	830	471.1
	8	26	61.5
	11	240	107.4
	13	1600	1426
	15	25	40.1
	16	400	240.3
	19	840	1369
	26	87	1093
	31	30	45.8
	33	16	58.5
	39	97	89.0
	41	170	43.9
	44	180	57.5
25	49	33	47.7
	50	1000	1005
	84	8.7	63.5
	N.D. : Not detected		

Example 14. Detection of the hepatitis B virus (HBV) core antigen

[0158] We have so far explained the detection of the HCV core antigen. We have investigated whether this treating method is applicable to the detection of structural proteins in other viruses.

[0159] A monoclonal antibody (Tokushu Menneki Kenkyuusho [Special Immunology Research Institute]) against HBV core antigen was diluted to a concentration of 3 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6, and was dispensed in an aliquot of 100 µl. After incubating overnight at 4 °C, the plate was washed with a phosphate buffer, and a 350 µl aliquot of 1% BSA solution was dispensed to the plate. After allowing to stand at room temperature for 2 hours, the 1% BSA solution was aspirated off, and 200 µl of the reaction solution was added.

[0160] A recombinant HBV core antigen was used as a standard, and five patient sera that tested positive for HBe antigen and negative for anti-HBe antibody and ten normal human sera were used as samples. To 100 µl of a sample, 50 µl of a treatment reagent (7.5% SDS, 0.75% CHAPS, 0.15% Triton X100, 2 M urea, 0.1 M histidine, 0.1 M tryptophan) was added and treated at 56 °C for 30 minutes. After the treatment, 50 µl thereof was added to a well filled with the reaction solution, and was incubated at room temperature for 90 minutes.

[0161] As a comparison (without pretreatment), 100 µl of each sample was diluted with 50 µl of purified water and 50 µl of the diluted sample was used for the reaction. After washing five times with the wash solution, a biotin-labeled anti-HBV core monoclonal antibody (a mixture of equal amounts of HBc-2, HBc-5, HBc-14) was added, and incubated at room temperature for 30 minutes. After washing five times with the wash solution, the avidin-labeled alkaline phosphatase was added and the mixture was reacted at room temperature for 30 minutes.

[0162] After washing five times with the wash solution, CDPstar (Emerald II) as the sensitizer was added, reacted at room temperature for 15 minutes, and relative chemiluminescence thereof was measured. A standard curve for a serially diluted recombinant HBV core antigen is shown in Fig. 17, and the amount of the core antigen in the measured samples is shown in Table 9. The detection limit was 21 ng/ml. When a cut-off value that distinguishes the core antigen-positive from the negative was defined at 60 ng/ml, all 10 normal human sera, with or without pretreatment, tested negative for the core antigen, and in the sera of patients with hepatitis B virus, the core antigen could not be detected in the case of no pretreatment, but with pretreatment, all the sera tested positive for the core antigen.

[0163] It is thought that in the sera of patients with the hepatitis B virus, pretreatment disrupted the virus particle and inactivated the anti-HBc antibody, thereby enabling the detection of the core antigen. From the foregoing, it was confirmed that this method of sample treatment is useful for the detection of the structural proteins of viruses other than HCV, such as HBV, that have DNA as the genome. Needless to say, this holds true for HCV-related viruses such as flaviviruses and retroviruses, for example HIV.

Table 9

Sample #	non-treated		pre-treated	
	HBV core Ag (ng/ml)	Judged	HBV core Ag (ng/ml)	Judged
Normal human sample 1	< 21	Neg.	< 21	Neg.
	2	Neg.	< 21	Neg.
	3	Neg.	< 21	Neg.
	4	Neg.	< 21	Neg.
	5	Neg.	46	Neg.
	6	Neg.	< 21	Neg.
	7	Neg.	47	Neg.
	8	Neg.	< 21	Neg.
	9	Neg.	26	Neg.
	10	Neg.	56	Neg.
HBV sample 11	< 21	Neg.	98	Pos.
	15	Neg.	94	Pos.
	20	Neg.	780	Pos.
	21	Neg.	270	Pos.
	46	Neg.	630	Pos.

Example 15. Method for effective detection without pretreatment of the antigen

[0164] HCV particle-containing samples were diluted in a surfactant-added reaction solution, and the efficiency of detecting the HCV antigen was investigated.

5 [0165] The detection of the HCV core antigen was carried out by a sandwich enzymeimmunoassay (EIA) using monoclonal antibody against the HCV core antigen. Among the monoclonal antibodies obtained in Example 3, C11-3 and C11-7 were used as the antibody for capturing the core antigen and C11-10 and C11-14 were used as the antibody for detecting the captured core antigen.

10 [0166] EIA was essentially carried out using the following conditions. Solutions of monoclonal antibodies C11-3 and C11-7, each of which was diluted to 4 µg/ml in an acetate buffer, were added to a microtiter plate and were incubated overnight at 4 °C. After washing with the phosphate buffer, a phosphate buffer containing 1% BSA, was added to effect blocking. To the plate were added 100 µl of the reaction solution and 100 µl of the sample. The plate was then stirred and incubated at room temperature for 1.5 hour. Unreacted substances were removed by washing with the phosphate buffer to which a low concentration of a surfactant had been added. Then the alkaline phosphatase-labeled monoclonal

15 antibodies C11-10 and C11-14 were added and reacted at room temperature for 30 minutes. After the reaction is over, unreacted substances were removed by washing with the phosphate buffer to which a low concentration of a surfactant had been added. Then a substrate solution (CDP-Star/Emerald11) was added and reacted at room temperature for 20 minutes. The amount of luminescence was measured.

20 [0167] To the above reaction, various surfactants were added to investigate their effects. By using HCV-positive sera in which the titer of antibody to HCV is below the detection limit and virtually no antibody to HCV is contained, the activity of the core antigen based on the amount of luminescence was expressed in terms of a reaction ratio relative to the amount of luminescence of the normal human serum that was defined as 1.0. The results are shown in Tables 10 and 11.

25

30

35

40

45

50

55

Table 10

Reactivity relative to normal human serum (S/N ratio)							
			NO 45	NO 46	NO 3	NO 7	NO 19
No addition			15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
Judgement criteria			> 30.0	> 2.0	> 2.0	> 2.0	> 2.0
Additive	HLB	(%)					
Anionic surfactant							
sodium dodecyl sulfate	40.0	0.5	5.42				
		2.0	5.73				
sodium dodecyl-N-sarcosinate		0.5	12.79	2.70			
		2.0	125.43	7.27	3.83	3.70	6.71
perfluoroalkylcarboxylic acid		0.5	10.55	1.27			
S-113		2.0	6.72	0.91			
Cationic surfactant							
cetyltrimethylammonium bromide		0.5	72.97	7.42	3.09	3.52	5.43
		2.0	44.55	5.35			
dodecylpyridinium chloride		0.5	53.43	4.70	2.05	1.52	2.33
		2.0	12.44	2.49			
n-dodecyltrimethylammonium		0.5	66.84	4.43	2.41	1.63	2.67
		2.0	27.98	3.77			
tetradecylammonium bromide		0.05	14.69				
n-octyltrimethylammonium chloride		0.5	12.57		1.00	0.74	0.99
		2.0	11.46				
n-decytrimethylammonium chloride		0.5	17.50		0.88	0.80	0.72
		2.0	45.21		1.12	1.08	1.41
Amphoteric surfactant							
CHAPS		0.5	29.57				
		2.0	25.32				
perfluoroalkylbetaine S-132 (from ASAHI GLASS)		0.5	11.07	1.61			
		2.0	10.77	1.49			
3-(dodecyldimethylammonio)-1-propane-sulfonic acid		0.5	57.69				
		2.0	113.19		4.57	3.44	5.26

Table 11

Reactivity relative to normal human serum (S/N ratio)							
		HLB (%)	NO 45	NO 46	NO 3	NO 7	NO 19
No addition			15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
Judgement criteria			> 30.0	> 2.0	> 2.0	> 2.0	> 2.0
Additive							
nonionic surfactant							
MEGA-10		0.5	32.11	3.38			
		2.0	38.49	3.53	1.97	1.87	2.84
Tween 20	16.7	0.5	16.88				
		2.0	12.36				
Tween 40	15.6	0.5	14.96		1.02	0.99	1.41
		2.0	19.10		1.32	1.25	1.64
Tween 80	15.0	0.5	12.45		1.33	1.23	1.10
		2.0	17.47				
Nonidet P-40	13.1	0.5	43.14		3.09	2.95	4.58
octyl glucoside		0.5	12.48		0.90	0.60	0.97
		2.0	25.07		1.92	1.20	2.63
Triton N101	13.4	0.5	26.50		1.85	1.62	2.70
		2.0	60.84		2.23	2.28	3.81
Triton X100	13.5	0.5	27.72				
		2.0	71.08		2.90	2.34	3.86
Triton X114	12.4	0.5	31.49		2.04	1.65	2.77
		2.0	58.62		1.92	2.11	2.51
Triton X305	17.3	0.5	10.50		0.94	0.97	1.08
		2.0	25.91		1.30	1.24	1.87
Triton X405	17.9	0.5	12.54		0.86	0.78	1.04
		2.0	24.92		1.21	1.24	1.25
Others							
benzyldimethylammonium chloride		0.5	5.45	1.00			
		2.0	7.01	1.12			
triethylamine		0.5	3.89	0.97			
Surfactant mixture							
2% sodium dodecyl-N-sarcosinate + 2% Triton X100			244.13		6.11	5.50	12.71

[0168] The results revealed that the addition of a nonionic surfactant having an HLB of 12 to 14, as represented by Triton X100, causes an increase in the amount of luminescence thereby enhancing detection sensitivity in HCV-positive sera compared to the normal human sera. It was also clarified that, similarly, as represented by sodium dodecyl-N-sarcosinate and dodecyl trimethylammonium, the addition of a surfactant having in its structure a straight-chain alkyl group having at the same time 10 or more carbon atoms and a secondary, tertiary, or quaternary amine causes an increase

in detection sensitivity in HCV-positive sera. No such increase in sensitivity was observed with the above surfactant with an alkyl group having not more than 8 carbons (n-octyl trimethylammonium chloride). It was also found that by mixing and adding these two surfactants (in Table 11, 2% sodium dodecyl-N-sarcosinate and 2% Triton X100 were mixed), detection sensitivity in HCV-positive sera can be further enhanced.

5 Example 16. Detection of the core antigen in the samples during a period between after HCV infection and before the appearance of anti-HCV antibody (window period)

[0169] By adding 2% Triton X100 and 2% sodium dodecyl-N-sarcosinate to the primary reaction solution, a commercially available seroconversion panel PHV905 (B.B.I. inc.) was measured according to Example 15. The PHV905 panel used turned positive on day 21 after the start of observation (serum No. PHV905-7) when measured by the anti-HCV antibody test (Ortho EIA 3.0). In the test, the antibody titer is expressed in a cut-off index (S/CO) with a value of 1.0 or greater being judged as positive. The activity of the HCV core antigen (the amount of luminescence) was expressed in the reactivity (S/N) relative to that of the normal human serum that was defined as 1.0.

[0170] As shown in Fig. 12, the activity of the core antigen is observed before the anti-HCV antibody appears, the addition of a surfactant exposed the core antigen from the virus particle, which reacted with the immobilized monoclonal antibody, thereby confirming the detection of the core antigen.

20 Table 12

Serum No.	Days after start of observation	HCV core Ag activity (S/N)	Anti-HCV Ab titer (S/CO)
PHV905-1	0	5.32	0.000
	4	8.30	0.000
	7	15.63	0.000
	11	4.37	0.300
	14	14.75	0.700
	18	7.57	0.700
	21	4.82	2.500
	25	3.31	5.000
	28	1.61	5.000

Reference to microorganisms defined in rule 13-2 of the Rule based on Patent Cooperation Treaty

40 [0171]

Name of depository: the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology

Address of depository: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan (Zip code 305)

45 (1) Indication of microorganism: HC11-3

Date deposited: July 4, 1997

Deposit number: FERM BP-6002

50 (2) Indication of microorganism: HC11-7

Date deposited: July 4, 1997

Deposit number: FERM BP-6003

55 (3) Indication of microorganism: HC11-10

Date deposited: July 4, 1997

Deposit number: FERM BP-6004

(4) Indication of microorganism: HC11-11

5 Date deposited: July 4, 1997

Deposit number: FERM BP-6005

(5) Indication of microorganism: HC11-14

10 Date deposited: July 4, 1997

Deposit number: FERM BP-6006

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENCE LISTING

<110> Tonen Corporation

5 <120> Method for Detection or Measurement of Hepatitis C V
irus

<160> 8

10 <210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

15 <400> 1

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Ser Leu Asp Arg Asp Pro Glu

5 10 15

Phe Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr

20 25 30

Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val

35 40 45

Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg

50 55 60

Ala Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg

65 70 75 80

Pro Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro

85 90 95

Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly

100 105 110

Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp

115 120 125

Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr

130 135 140

40 Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe

145 150 155 160

Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu

45 165 170 175

Asp

<210> 2

50 <211> 160

<212> TRP

<213> Hepatitis C virus

<400> 2
Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
5 5 10 15
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
10 35 40 45
Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg Pro
15 50 55 60
Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly
65 70 75 80
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp
20 85 90 95
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
100 105 110
Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
25 115 120 125
Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe Leu
130 135 140
Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
30 145 150 155 160
<210> 3
<211> 20
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence
<220>
<223>
40 <400> 3
Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly Val Tyr Leu
5 10 15
Leu Pro Arg Arg
45 20
<210> 4
<211> 10
<212> PRT
50 <213> Artificial Sequence
<220>

5 <223>
 <400> 4
 Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg
 5 10
 10 <210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223>
 <400> 5
 Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg
 1 5 10 15
 20 Ser Arg Asn Val Gly
 20 <210> 6
 25 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 30 <230>
 <400> 6
 Asp Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Lle Asp Thr Leu
 1 5 10 15
 35 Thr Cys Gly Phe
 20 <210> 7
 40 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220> Probe
 45 <230> Synthetic DNA
 <400> 7
 gaattcatgg gcacgaatcc taaa 24
 50 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

10 <220> Probe

15 <230> Synthetic DNA

20 <400> 8

25 ttagtccctcc agaaccggga c

21

10

15 Claims

1. A method for treating virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) an anionic surfactant and (2) an amphoteric surfactant, nonionic surfactant or protein denaturant.
2. A method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) an anionic surfactant, (2) an amphoteric surfactant and (3) a nonionic surfactant or protein denaturant.
3. A method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) an anionic surfactant, (2) an amphoteric surfactant, (3) a nonionic surfactant and (4) a protein denaturant.
4. A method according to any one of claims 1 to 4, wherein said treatment solution further contains urea, an imidazole ring-containing compound or an indole ring-containing compound.
5. A method according to claim 4, wherein said imidazole ring-containing compound is imidazole, histidine, imidazole-acrylic acid, imidazolecarboxyaldehyde, imidazolecarboxamide, imidazoledione, imidazoledithiocarboxylic acid, imidazoledicarboxylic acid, imidazolemethanol, imidazolidinethione, imidazolidone, histamine or imidazopyridine.
6. A method according to claim 4, wherein said indole ring-containing compound is tryptophan, indoleacrylic acid, indole, indoleacetic acid, indoleacetic hydrazide, methyl indoleacetate, indolebutyric acid, indoleacetonitrile, indole-carbinol, indolecarboxyaldehyde, indolecarboxylic acid, indoleethanol, indolelactic acid, indolemethanol, indolepro-pionic acid, indolepyruvic acid, indolyl methyl ketone, indomycin, indoleacetone, indomethacin, indoprofen or indolamine.
7. A method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) a chaotropic ion and (2) an acidifying agent.
8. A method for treating a virus-containing sample, characterized by treatment of a virus-containing sample with a treatment solution containing (1) a chaotropic ion, (2) an acidifying agent and (3) a nonionic surfactant.
9. A method according to any one of claims 1 to 8, wherein said virus is a virus which forms virus particles having a structure comprising a structural protein encapsulating genomic RNA or DNA and a membrane protein or lipid membrane surrounding it.
10. A method according to claim 9, wherein said virus is hepatitis C virus (HCV), hepatitis D virus, hepatitis E virus, hepatitis G virus, hand-foot-and-mouth disease virus, a flavivirus (yellow fever virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, dengue virus), a togavirus (alpha-virus, rubivirus, arterivirus, rubella virus), a pestivirus (hog cholera virus, bovine diarrhea virus), a paramyxovirus (parainfluenza virus 1, 2, 3, 4, canine distemper virus, New-castle disease virus, RS virus, rinderpest virus, simian parainfluenza virus, measles virus, mumps virus), an orthomyxovirus (human influenza virus, avian influenza virus, equine influenza virus, swine influenza virus), a rhab-dovirus (rabies virus, vesicular stomatitis virus), a picornavirus (poliovirus, Coxsackie virus, echovirus, bovine

5 enterovirus, porcine enterovirus, simian enterovirus, mouse encephalitis virus, human rhinovirus, bovine rhinovirus, equine rhinovirus, foot and mouth disease virus, hepatitis A virus), a coronaviruses (human coronavirus, avian infectious bronchitis virus, mouse hepatitis virus, porcine transmissible gastroenteritis virus), an arenavirus (lymphocytic choriomeningitis virus, lassa virus, Korean hemorrhagic fever virus), a retrovirus (HTLV: human adult leukemia virus, HIV: AIDS virus, feline leukemia sarcoma virus, bovine leukemia virus, Rous sarcoma virus), a reovirus (rotavirus), a calicivirus (Norwalk virus), a bunyavirus (renal syndrome hemorrhagic fever virus), a phylloivirus (Ebola virus, Marburg virus), hepatitis B virus (HBV), a pox virus (vaccinia virus, alastrim virus, cowpox virus, smallpox virus), a parvovirus (human parvovirus, porcine parvovirus, bovine parvovirus, canine parvovirus, feline leucopenia virus, Aleutian mink disease virus), a papovavirus (papilloma virus, polyoma virus), adenovirus, a herpes virus (herpes simplex virus, cytomegalovirus, chickenpox herpes zoster virus, EB virus, equine herpes virus, feline herpes virus, Marek's disease virus) or African swine cholera virus.

- 10
11. A method according to any one of claims 1 to 10, wherein said virus is hepatitis C virus (HCV) or hepatitis B virus (HBV).
 - 15 12. A virus assay method, characterized by using a sample treating method according to any one of claims 1 to 10 and reacting it with a probe which specifically recognizes a virus antigen, for detection or quantitation of the presence of the virus antigen.
 - 20 13. A hybridoma cell line selected from the group consisting of HC11-11 (FERM BP-6005), HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004), HC11-3 (FERM BP-6002) and HC11-7 (FERM BP-6003).
 - 25 14. A monoclonal antibody produced by a hybridoma selected from the group consisting of HC11-11 (FERM BP-6005), HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004), HC11-3 (FERM BP-6002) and HC11-7 (FERM BP-6003).
 - 30 15. A kit, assay kit or diagnostic reagent for determining the presence or absence of a virus in a sample, which is for use in an immunoassay method according to claim 12 and comprises an anionic surfactant.
 - 35 16. A kit, assay kit or diagnostic reagent for determining the presence or absence of a virus in a sample, which is for use in an immunoassay method according to claim 12 and comprises a monoclonal antibody according to claim 14.
 - 40 17. A kit, assay kit or diagnostic reagent for determining the presence or absence of a virus in a sample, which is for use in an immunoassay method according to claim 12 and comprises a chaotropic agent.
 - 45 18. A kit, assay kit or diagnostic reagent for determining the presence or absence of HCV in a sample, which is for use in an immunoassay method according to claim 12 and comprises a monoclonal antibody produced by hybridoma HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004) or HC11-11 (FERM BP-6005).
 - 50 19. A diagnostic kit according to any one of claims 15 to 17 which further includes urea, an imidazole ring-containing compound or an indole ring-containing compound.
 20. A diagnostic kit according to claim 19, wherein said imidazole ring-containing compound is imidazole, histidine, imidazoleacrylic acid, imidazolecarboxyaldehyde, imidazolecarboxamide, imidazoleidine, imidazoleedithiocarboxylic acid, imidazoledicarboxylic acid, imidazolemethanol, imidazolidinethione, imidazolidone, histamine or imidazopyridine.
 - 55 21. A diagnostic kit according to claim 19, wherein said indole ring-containing compound is tryptophan, indoleacrylic acid, indole, indoleacetic acid, indoleacetic hydrazide, methyl indoleacetate, indolebutyric acid, indoleacetonitrile, indolecarbinol, indolecarboxyaldehyde, indolecarboxylic acid, indoleethanol, indolelactic acid, indolemethanol, indolepropionic acid, indolepyruvic acid, indolyl methyl ketone, indomycin, indoleacetone, indomethacin, indoprofen or indolamine.
 22. A virus assay method characterized by measurement of a virus antigen based on its binding with a probe in the presence of a surfactant with an alkyl group of 10 or more carbon atoms and a secondary, tertiary or quaternary amine, or a nonionic surfactant with a hydrophilic/lipophilic balance (HLB) of 12-14.
 - 55 23. A method according to claim 22, wherein said surfactant having an alkyl group and a secondary, tertiary or quaternary amine is a surfactant with an alkyl group of 10-20 carbon atoms and a tertiary or quaternary amine.

24. A method according to claim 22 or 23, wherein said tertiary or quaternary amine surfactant is dodecyl-N-sarcosinic acid, a cetyl or dodecytrimethylammonium salt, 3-(dodecyldimethylammonio)-1-propanesulfonic acid, a dodecylpyrimidium salt or decanoyl-N-methylglucamide (MEGA-10).

5 25. A method according to either of claims 23 or 24, wherein said nonionic surfactant is polyoxyethylene isooctyl phenyl ether or polyoxyethylene nonyl phenyl ether.

26. A method according to any one of claims 22 to 25, wherein said virus antigen probe is an antibody for the virus antigen.

10 27. A method according to any one of claims 22 to 26, wherein said virus is a virus which forms virus particles having a structure comprising a structural protein encapsulating genomic RNA or DNA and a membrane protein or lipid membrane surrounding it.

15 28. A method according to claim 27, wherein said virus is hepatitis C virus (HCV), hepatitis D virus, hepatitis E virus, hepatitis G virus, hand-foot-and-mouth disease virus, a flavivirus (yellow fever virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, dengue virus), a togavirus (alpha-virus, rubivirus, arterivirus, rubella virus), a pestivirus (hog cholera virus, bovine diarrhea virus), a paramyxovirus (parainfluenza virus 1, 2, 3, 4, canine distemper virus, New-castle disease virus, RS virus, rinderpest virus, simian parainfluenza virus, measles virus, mumps virus), an orthomyxovirus (human influenza virus, avian influenza virus, equine influenza virus, swine influenza virus), a rhabdovirus (rabies virus, vesicular stomatitis virus), a picornavirus (poliovirus, Coxsackie virus, echovirus, bovine enterovirus, porcine enterovirus, simian enterovirus, mouse encephalitis virus, human rhinovirus, bovine rhinovirus, equine rhinovirus, foot and mouth disease virus, hepatitis A virus), a coronavirus (human coronavirus, avian infectious bronchitis virus, mouse hepatitis virus, porcine transmissible gastroenteritis virus), an arenavirus (lymphocytic choriomeningitis virus, lassa virus, Korean hemorrhagic fever virus), a retrovirus (HTLV: human adult leukemia virus, HIV: AIDS virus, feline leukemia sarcoma virus, bovine leukemia virus, Rous sarcoma virus), a reovirus (rotavirus), a calcivirus (Norwalk virus), a bunyavirus (renal syndrome hemorrhagic fever virus), a phyllovirus (Ebola virus, Marburg virus), hepatitis B virus (HBV), a pox virus (vaccinia virus, alastrim virus, cowpox virus, small-pox virus), a parvovirus (human parvovirus, porcine parvovirus, bovine parvovirus, canine parvovirus, feline leucopenia virus, Aleutian mink disease virus), a papovavirus (papilloma virus, polyoma virus), adenovirus, a herpes virus (herpes simplex virus, cytomegalovirus, chickenpox herpes zoster virus, EB virus, equine herpes virus, feline herpes virus, Marek's disease virus) or African swine cholera virus.

25 29. A method according to any one of claims 22 to 28, wherein said virus is hepatitis C virus (HCV) or hepatitis B virus (HBV).

40

45

50

55

Fig. 1

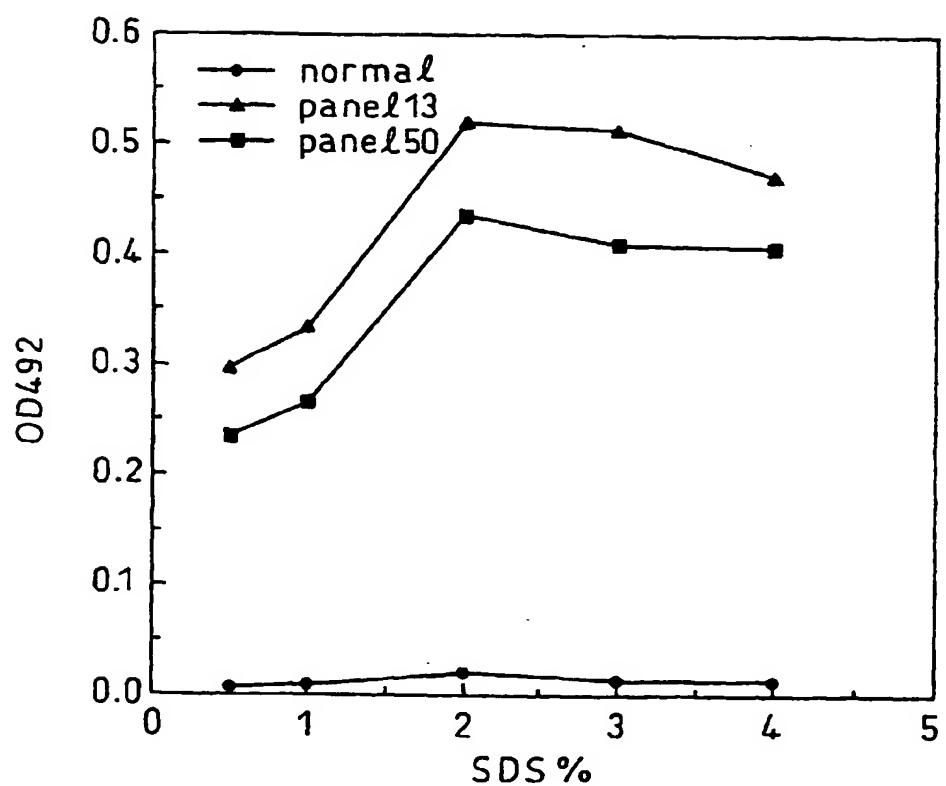


Fig. 2

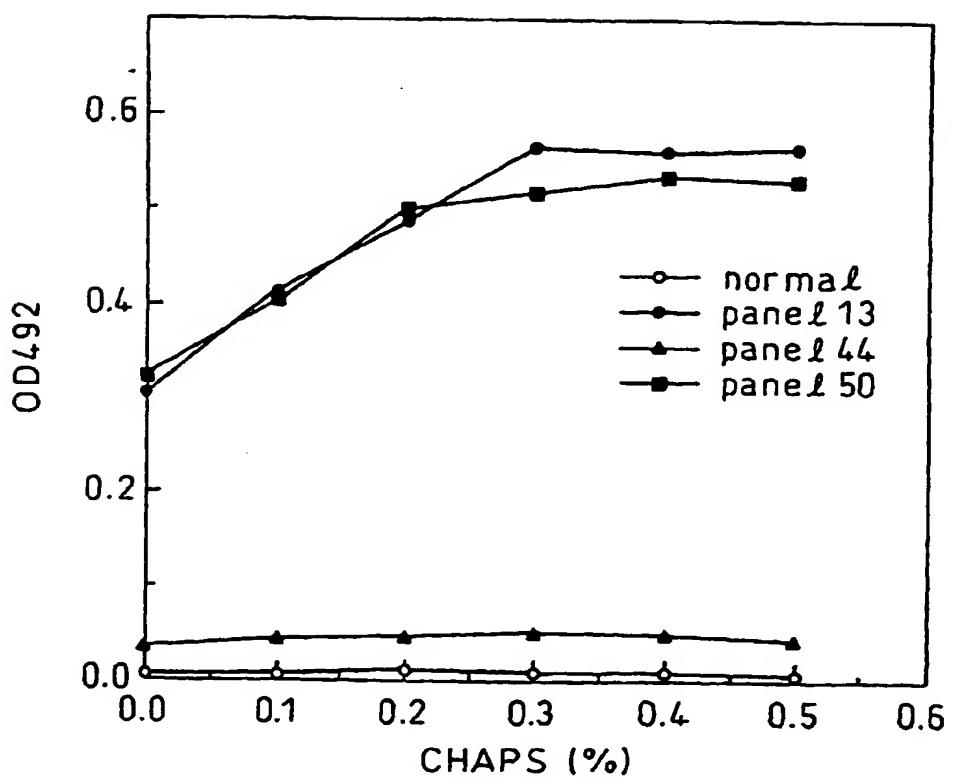


Fig. 3

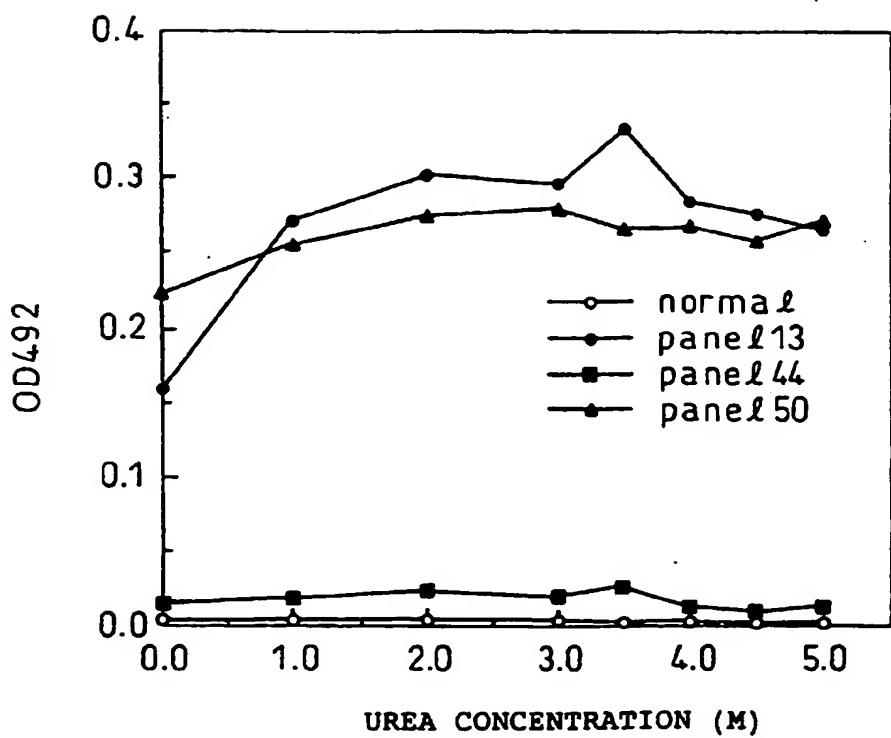


Fig. 4

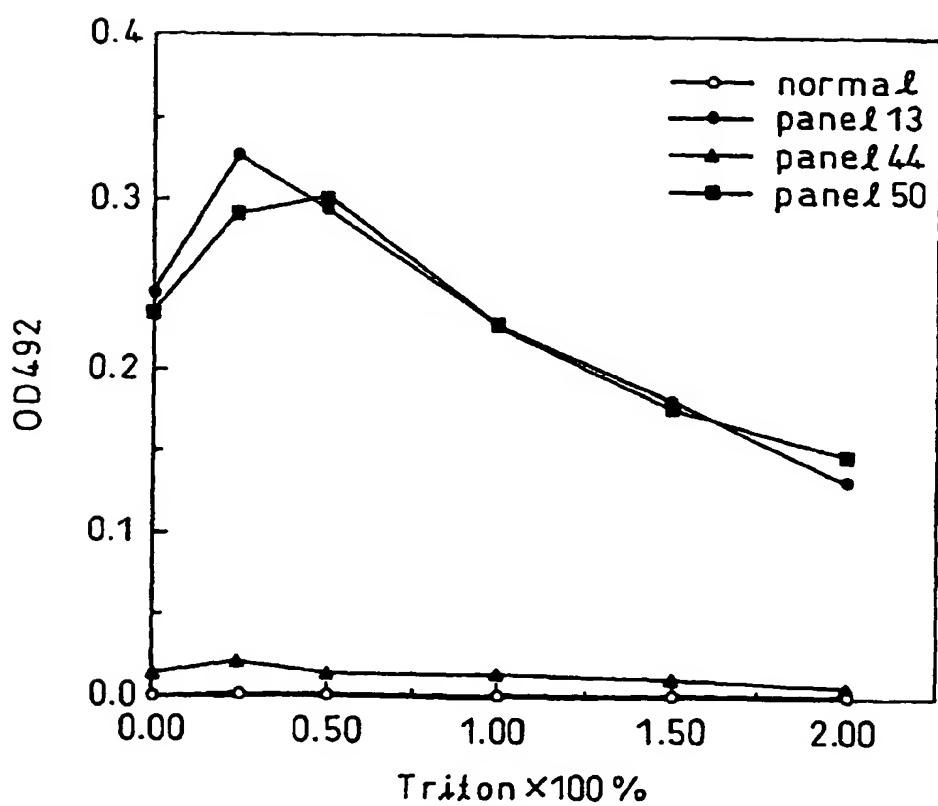


Fig. 5

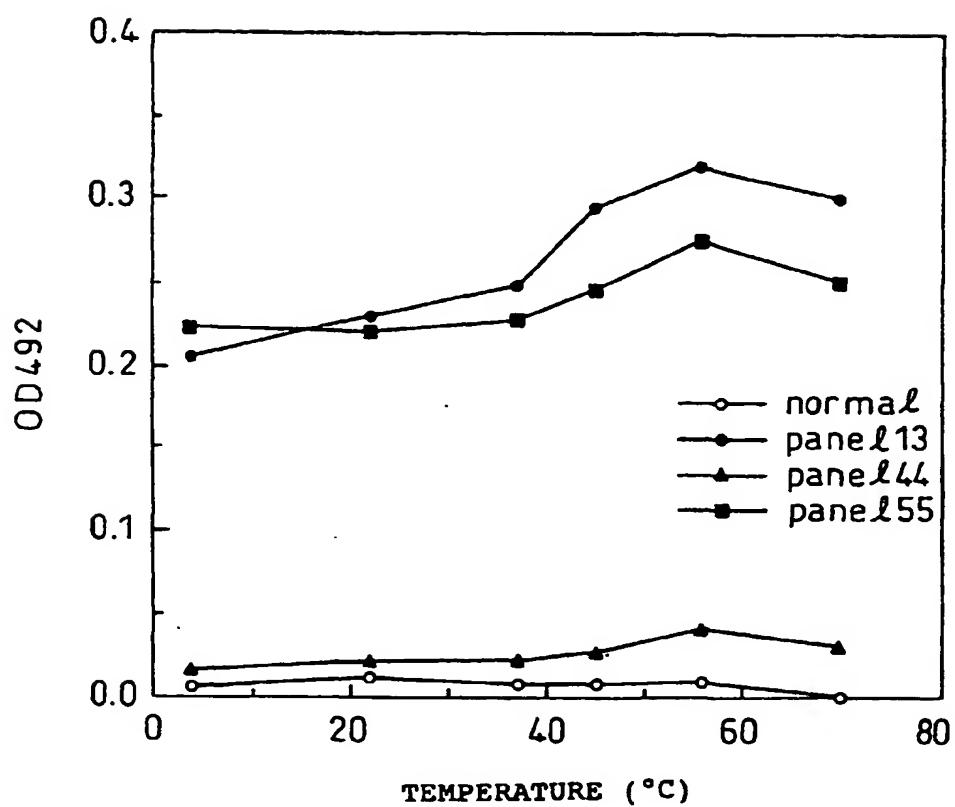


Fig. 6

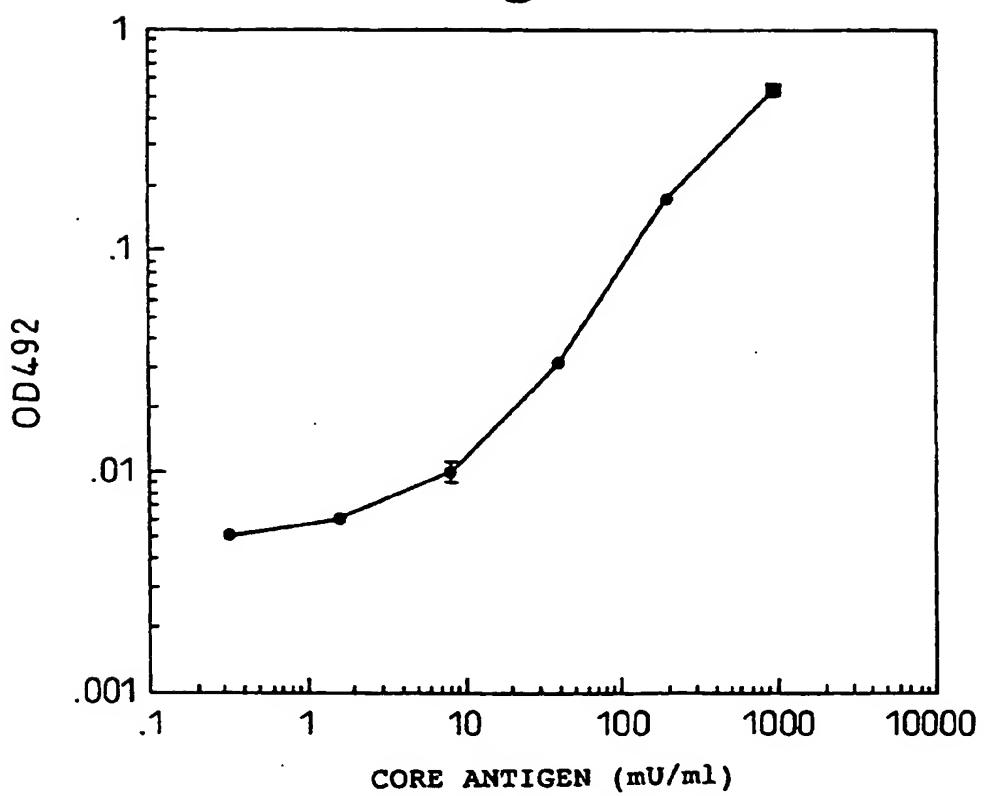


Fig. 7

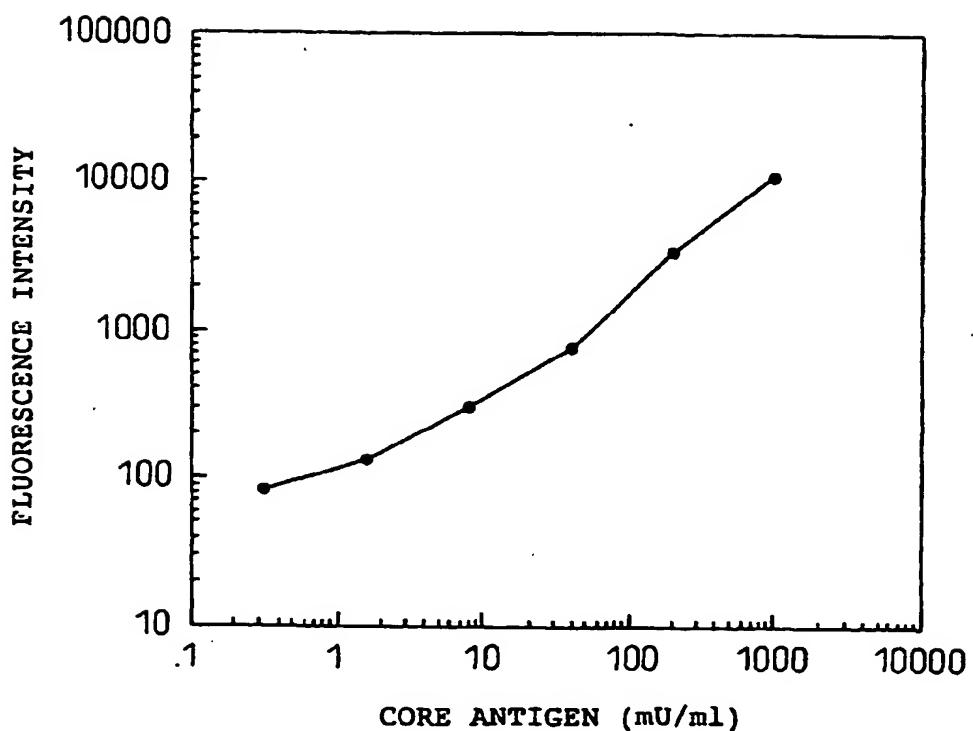


Fig. 8

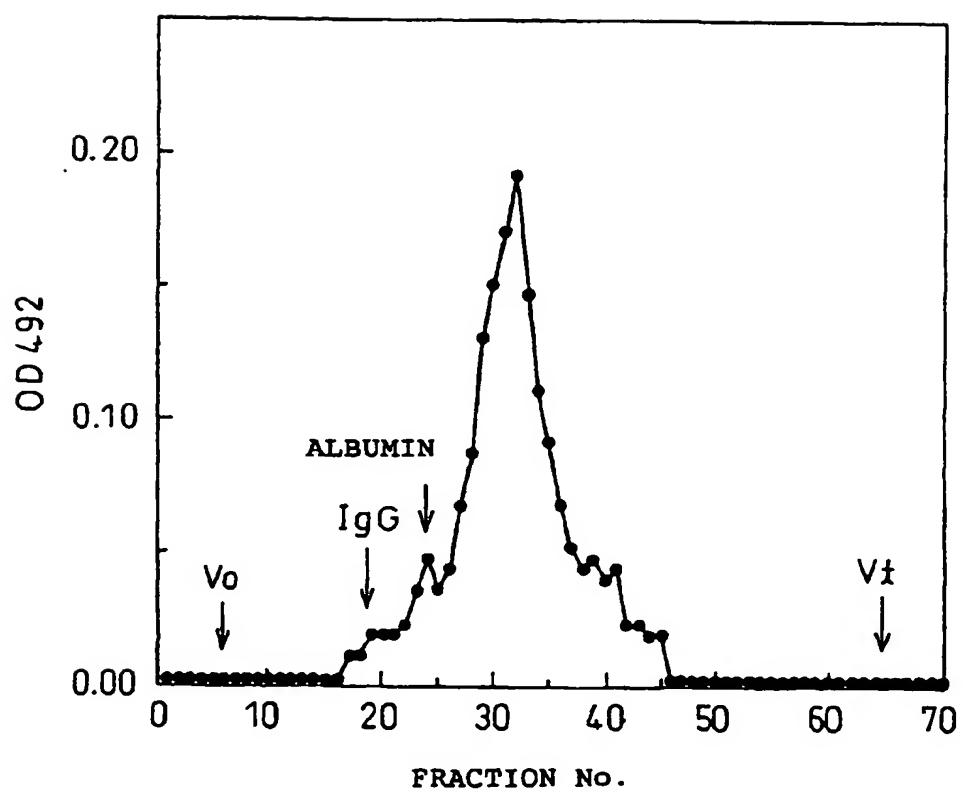


Fig. 9

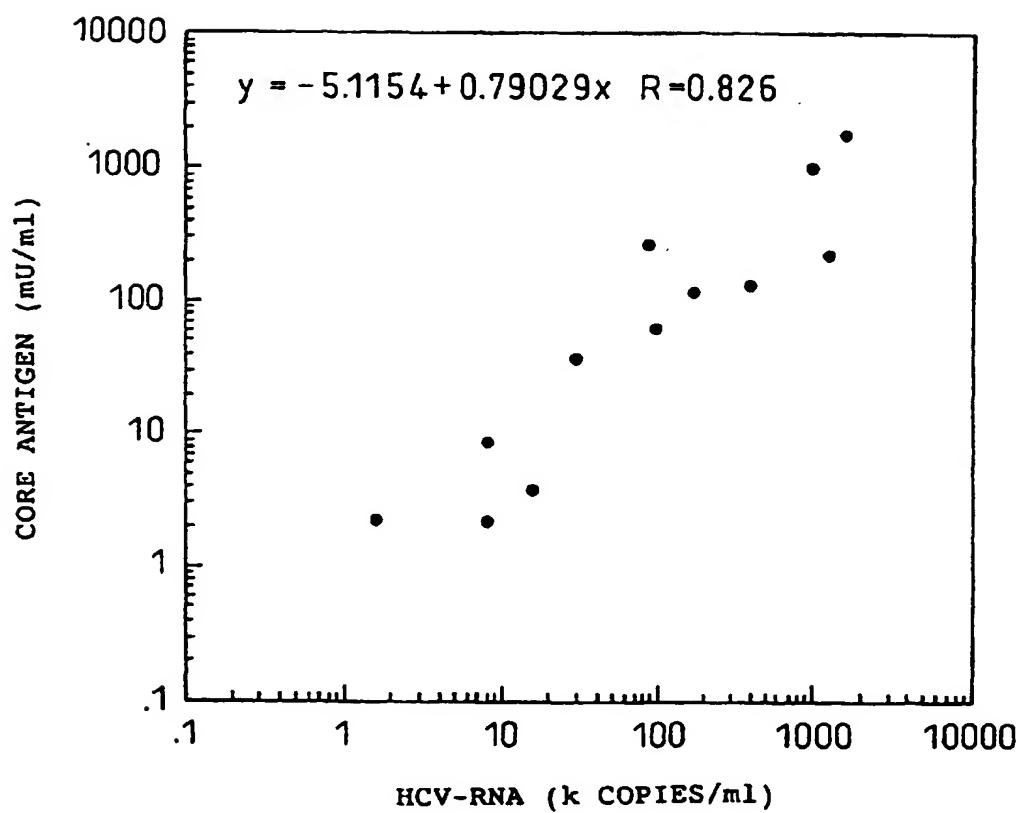


Fig.10

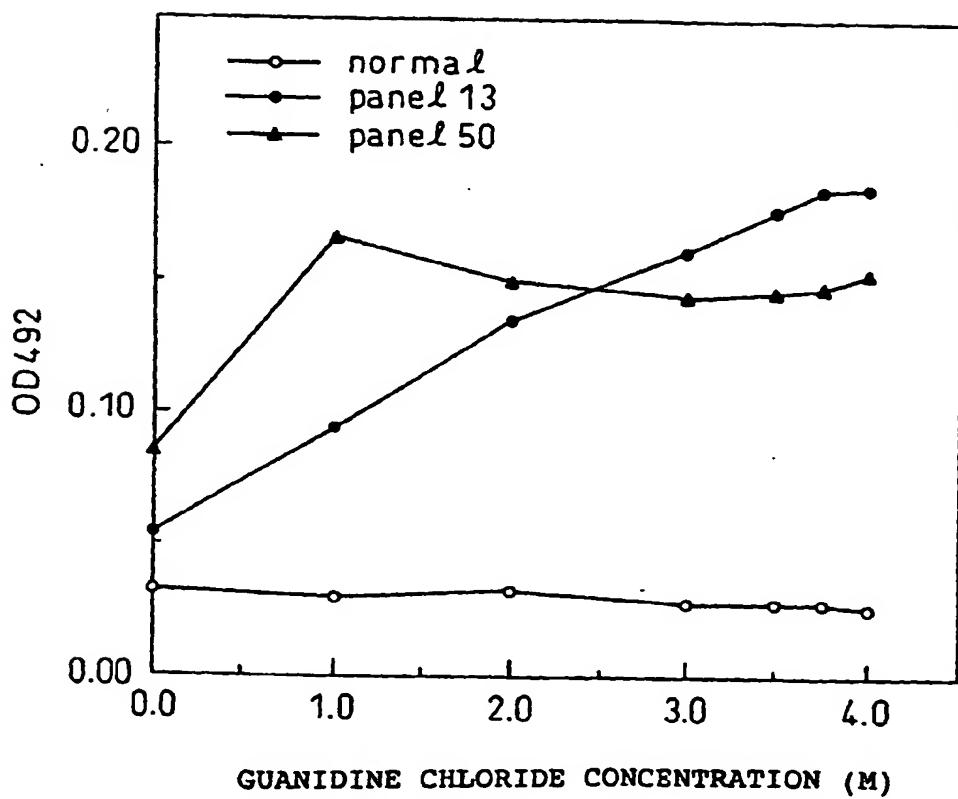


Fig.11

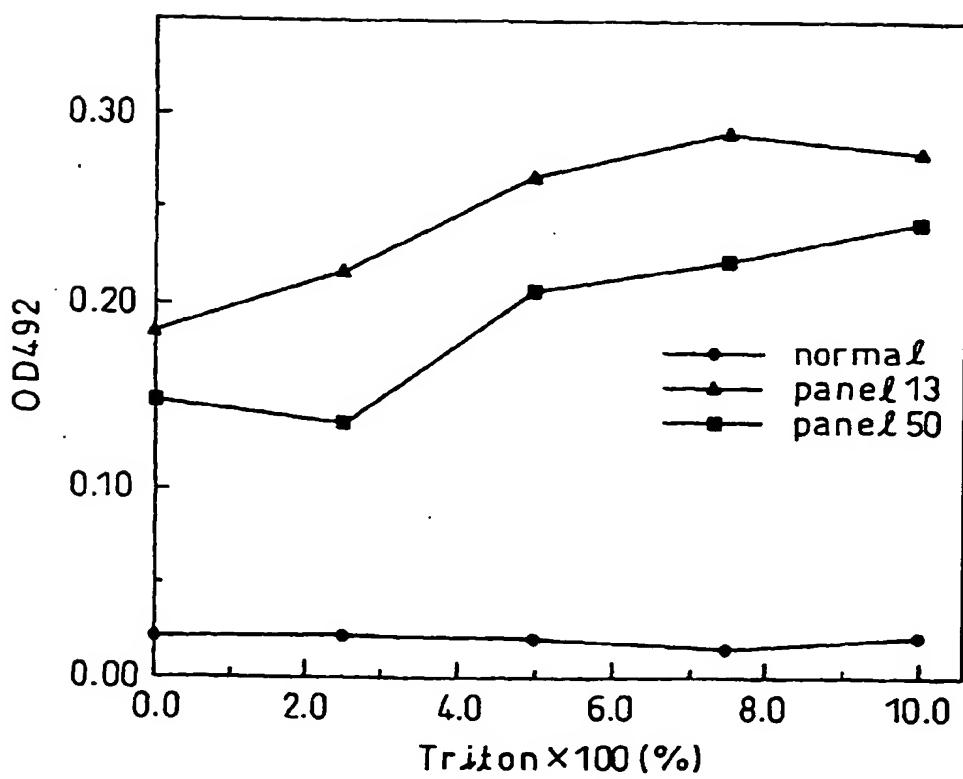


Fig. 12

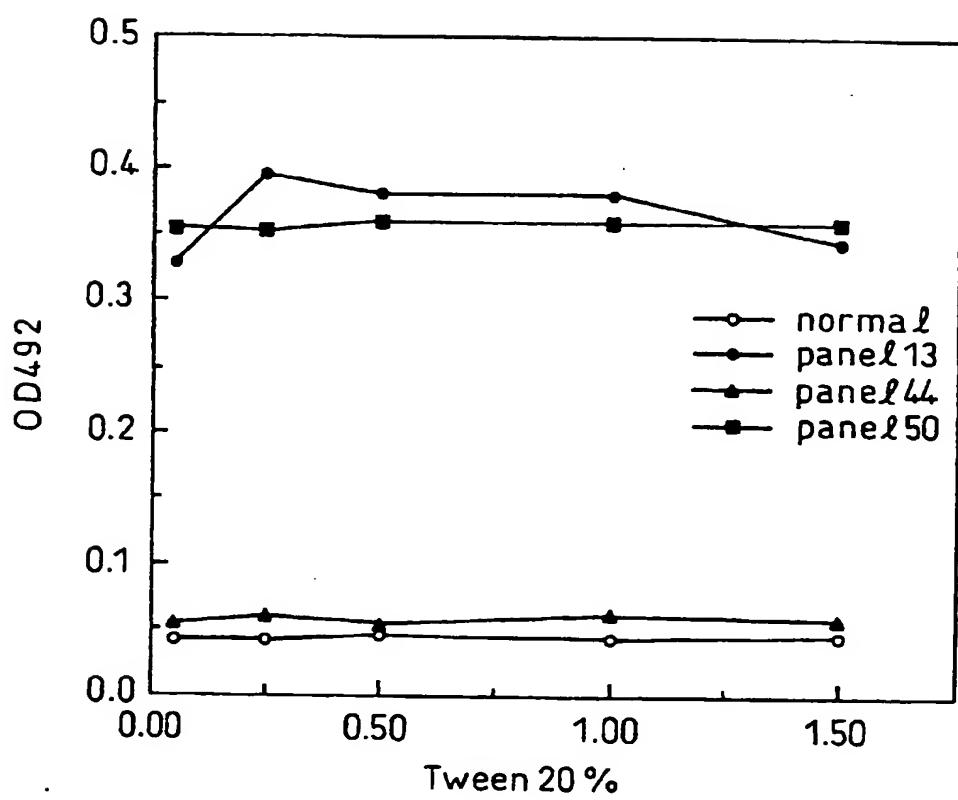


Fig. 13

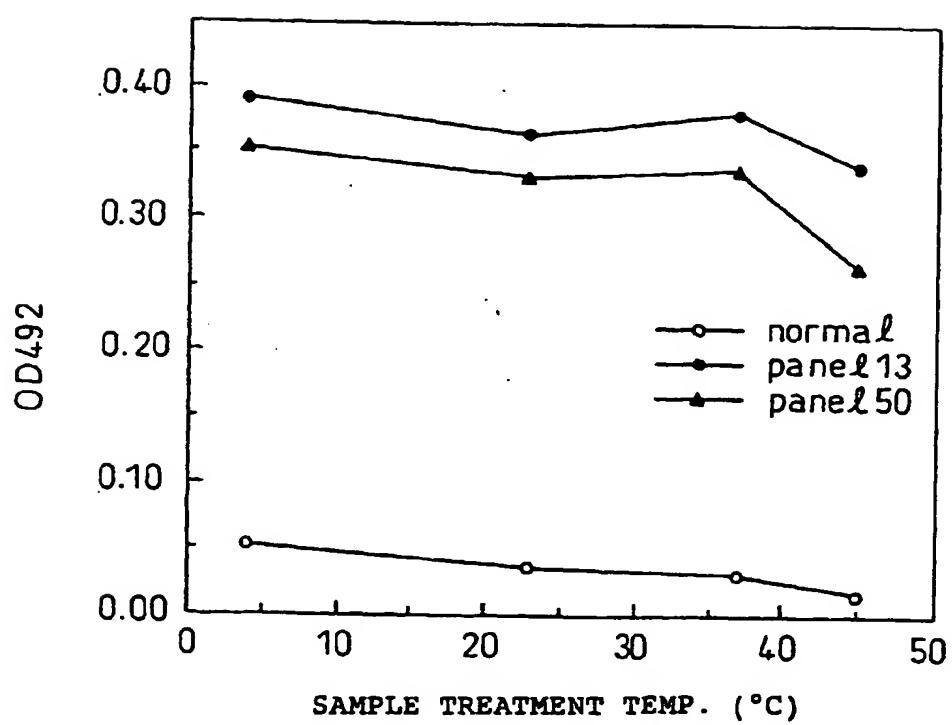


Fig. 14

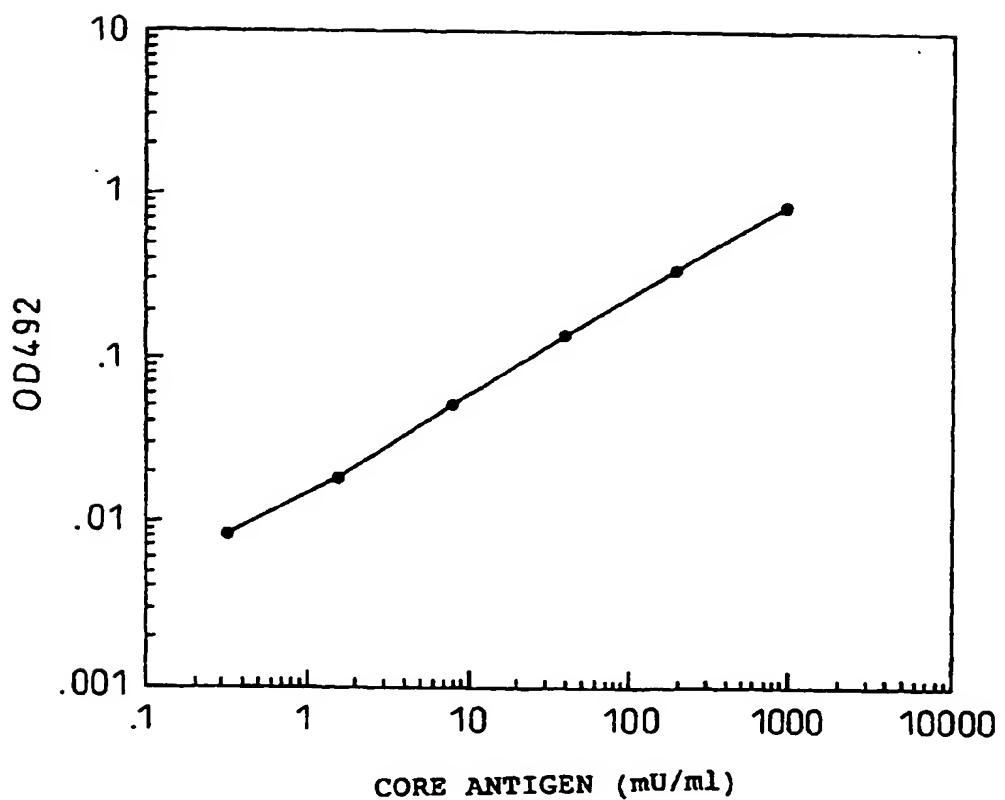


Fig. 15

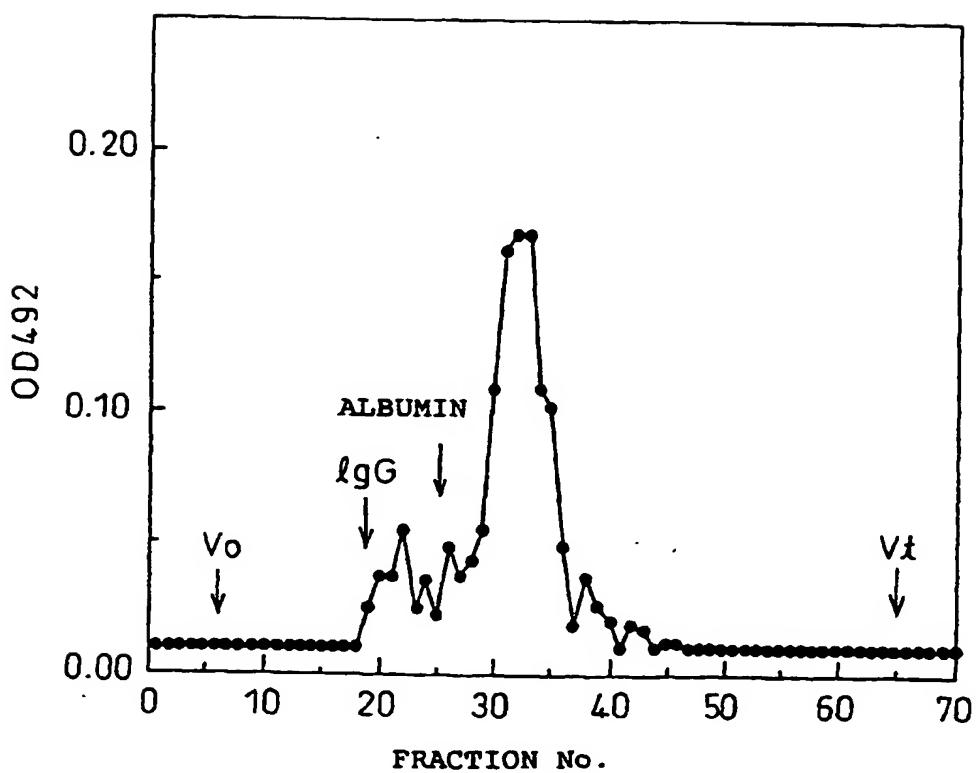


Fig. 16

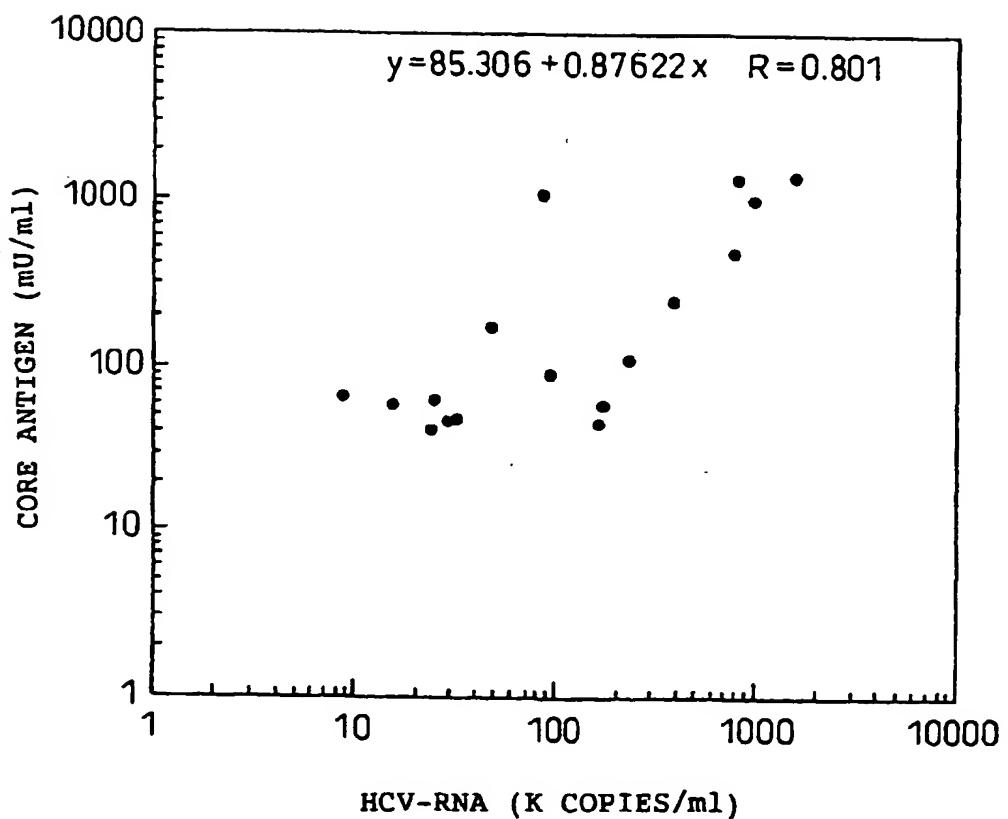
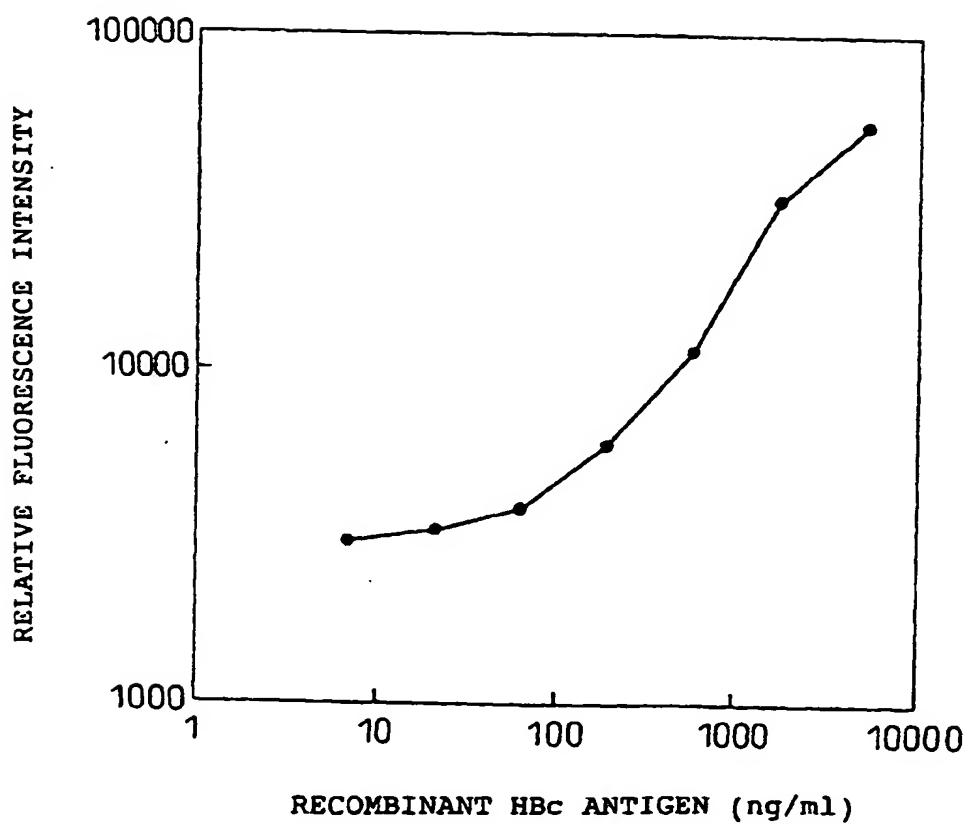


Fig. 17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ G01N33/569, G01N33/576		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ G01N33/569, G01N33/576		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1998 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1998		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 8-50133, A (Toray Industries, Inc.), 20 February, 1996 (20. 02. 96), Claims ; Par. Nos. [0019] to [0023] (Family: none)	1, 4, 9-12, 15-17, 19, 22, 25-29
A		2, 3, 5-8, 20, 21, 23, 24
X	JP, 8-29427, A (Tonen Corp.), 2 February, 1996 (02. 02. 96), Claims ; Par. Nos. [0016], [0087] & EP, 717104, A	13, 14, 18
A	JP, 53-104724, A (The Green Cross Corp.), 12 September, 1978 (12. 09. 78) (Family: none)	1-29
A	JP, 63-185996, A (Abbott Laboratories), 1 August, 1988 (01. 08. 88) & EP, 272483, A	1-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 27 October, 1998 (27. 10. 98)		Date of mailing of the international search report 10 November, 1998 (10. 11. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03476

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- I. The group of inventions as set forth in claims 1 to 12, 15 to 17 and 19 to 29 relates to methods for treating virus samples containing specific reagents such as surfactants or methods for immunologically assaying virus samples and kits to be used in these methods.
 - II. The group of inventions as set forth in claims 13, 14 and 18 relates to a hybridoma, a monoclonal antibody produced by this hybridoma, and an assay kit with the use of this monoclonal antibody.
- The technical features of group I reside in that in treating or

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP98/03476

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

immunologically assaying virus-containing samples, these samples are treated with specific reagents such as surfactants or these reagents are present together with the samples in the assay step, while the technical features of group II reside in the hybridoma and the monoclonal antibody per se obtained from this hybridoma. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding technical features.